

Série A, n° 897

N° d'ordre :

921

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université
(mention Sciences)

par

Michel HUBERT-HABART

1ère THESE : Le benzo-3,4 pyrène pyroformé dans les produits
de combustion de la cigarette. Détection, dosage,
recherche des facteurs d'inhibition.

2ème THESE : L'alcoylation des phénols.

Soutenues le 23 Mars 1960 devant la Commission d'examen

MM. C. PREVOST : Président

P. RUMPF : Examinateurs

R. DAUDEL

Série A, n° 897

N° d'ordre :

921

T H E S E S

présentées

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université
(mention Sciences)

par

Michel HUBERT-HABART

1ère THESE : Le benzo-3,4 pyrène pyroformé dans les produits
de combustion de la cigarette. Détection, dosage,
recherche des facteurs d'inhibition.

2ème THESE : L'alcoylation des phénols.

Soutenues le 25 Mars 1960 devant la Commission d'examen



MM. C. PREVOST : Président

P. RUMPF : Examineurs

R. DAUDEL

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen J. PERES

G. JULIA	T Analyse supérieure et algèbre supér.	DANJON	T Astronomie
de BROGLIE	T Théories physiques	PETIT	T Biologie maritime
PRENANT	T Anatomie et histol. comparées	QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique
PERES	T Mécanique des fluides et applications	GALLIEN	T Embryologie
BARRABE	T Géologie structurale et Géol. appliquée	EICHHORN	T Biologie végétale (S.P.C.N.)
BOURCART	T Géogr. physique et géol. dynamique	DE CUGNAC	T Biologie végétale (S.P.C.N.)
PLANTEFOL	T Botanique	Mlle CAUCHOIS	T Chimie Physique
GRASSE	T Evolution des êtres organisés	THELLIER	T Physique du Globe
PREVOST	T Chimie organique	L'HERITIER	T Génétique
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie	GRIVET	T Radioélectricité
CHAUDRON	T Chimie appliquée	PONCIN	T Mécanique générale
WYART	T Minéralogie	DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres
TEISSIER	T Zoologie	QUELET	T Chimie organique
MANGENOT	T Biol. végétale	CAGNIARD	T Géophysique appl.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité	CHAMPETIER	T Chimie macromolécul.
MONNIER	T Physiologie générale	CUVILLIER	T Micropaléontologie
PIVETEAU	T Paléontologie	JUNG	T Pétrographie
ROCARD	T Physique (E.N.S.)	TRILLAT	T Microscopie et diffrac. électronique
H. CARTAN	T Mathématiques (ENS)	WIEMANN	T Chimie organique et structurale
LAFFITTE	T Chimie générale	JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste
FAVARD	T Géométrie supérieure	VASSY	T Physique de l'atmosphère
COULOMB	T Physique du Globe	DESTOUCHES	T Théories physiques
Mlle COUSIN	T Biologie animale (S.P.C.N.)	M. PRUVOST	T Géologie
CHRETIEN	T Chimie minérale	AMIEL	T Chimie générale
P. DRACH	T Zoologie	HOCART	T Minéralogie
KASTLER	T Physique (E.N.S.)	J.P. MATHIEU	T Physique (option) (Orsay)
EPHRUSSI	T Génétique	COUTEAUX	T Biol. animale (PCB)
WURMSER	T Biologie physico-chimique	MAY	T Zoologie (Orsay)
RIVIERE	T Géologie (SPCN) Orsay	CHOQUET	T Théor. des fonct. et topologie
GAUTHERET	T Biol. végétale (PCB)	FEIDMANN	T Biologie végétale marine
LUCAS	T Recherches physiques	GUINIER	T Physique des solides
A. THOMAS	T Biol. cellulaire	JOST	T Physiol. comparée
ARNULF	T Optique appliquée	FORTET	T Calcul des prob. et physique math.
M. MORAND	T Enseignement de physique	SCHWARTZ	T Calcul diff. et Intégr.
SOLEILLET	T Physique (P.C.B.)	CHOUARD	T Physiologie végétale
FORTIER	T Mécanique expér. des fluides		

ORIGINAL ARTICLES

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION
PUBLISHED WEEKLY
CHICAGO, ILL., U.S.A.
1917

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION
PUBLISHED WEEKLY
CHICAGO, ILL., U.S.A.
1917

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION
PUBLISHED WEEKLY
CHICAGO, ILL., U.S.A.
1917

THE JOURNAL OF THE AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION
PUBLISHED WEEKLY
CHICAGO, ILL., U.S.A.
1917

MALAVARD	T Aviation	Mme LELONG	T Mathem (E.N.S.)
BRELOT	T Calcul différentiel	BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.)
NORMANT	T Synthèse organique	COTTE	T Physique (Orsay)
BENARD	T Chimie minérale	DUBOIS J.E.	T Chimie organique
BUVAT	T Botanique (E.N.S.)	LAMOTTE	Zoologie (E.N.S.)
DUGUE	T Statistiques mathém.	MICHEL André	T Chimie (S.P.C.N.)
GELOSO	T Chimie (S.P.C.N.)	OLMER	T Energétique Générale
SOULAIRAC	T Psychophysiology	ROUAULT	T Physique générale
ULRICH	T Physiol.Végétale	GAUTHIER	T Mécanique appliquée
MARECHAL	T Optique théorique et appliquée	BARCHEWITZ	T Chimie physique
KIRRMANN	T Théories chimiques	BROSSEL	T Physique atomique
CHADEFAUD	T Botanique	BUSER	Physiol. comparée
		CAMUS	Physiol.Vég.(3e cycle)
		CASLAING	Physique générale
Mle LE BRETON	T Physiol. Générale	CURIEN	Minéralogie et cristallographie
SALEM	T Mathématiques générales		
LELONG	T Mathématiques générales	MOYSE	T Physiol. Vég. (Orsay)
DEVILLIERS	T Anatomie et Histologie comparées	PANNETIER	Chimie (S.P.C.N.)
EHRESMANN	T Topologie algébrique	POSSOMPES	T Zoologie
FRANCON	T Physique (S.P.C.N.)	PULLMANN	Chimie théorique
GLANGEAUD	T Géog. physique et géologie dynamique	TEILLAC	Physique nucléaire et radioactivité
GODEMENT	T Mathématiques (M.G.P.)	TONNELAT	Biol. physico-chimique
PISOT	T Technique mathématique de la Physique	VILLE	T Econométrie
ROCH E.	T Géologie	WILLEMART	Chimie (P.C.B.)
SCHATZAMM	T Astrophysique	DODE	T Chimie (S.P.C.N.)Orsay
TERMIER	T Paléontologie stratigraphique	FREYMAN	T Physique générale
ZAMANSKY	T Mathématiques générales	GUINOCHET	T Biol. Vég.(Orsay)
LENNUIER	T Physique (M.G.P.)	ROLLET	T Chimie (P.C.B.)
RIZET	Génétique	Mle JOSIEN	T Chimie (P.C.B.)
ROUTHIER	T Géologie appliquée	CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes
Mme TONNELAT	T relativité	ARNOULT	T Electronique
DIXMIER	T Mathématiques (M.P.C.)	CHAPELLE	T Physique (M.P.C.)Orsay
SOUCHAY	T Chimie générale	DELANGE	T Mathématiques (Orsay)
AIGRAIN	T Electrotech.générale	DENY	T Mathématiques (M.G.P.)
M. LEVY	T Physique théorique des Hautes énergies	GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides
		LUCAS G.	T Géologie
		ALLARD	Chimie Physique
Mme CHAIX	Chimie biologique	BERTHELOT	Phys. Nucl. et Radioactivité
Mme HUREL-PY	Biol.Vég. (P.C.B.)		Météorologie et Phys. de l'atmosphère
PIAUX	Chimie (M.P.C.)	BRICARD	Psycho-Physiol.
BRUN	T Mécanique expérimentale des fluides	Mme ALBE-FESSARD	Physique des Solides
LEDERER	T Chimie biologique	FRIEDEL	Etude des Molécules organiques complexes
Mme DUBREIL	T Mathématiques	M. JULIA	

LENDER		Biol. Animale (S.P.C.N.) Orsay
MAGAT		Physico-chimie des Rayonn.
Mle QUINTIN	T	Electrochimie
MONOT	T	Chimie du métabolisme
BENOIT	T	Physiologie animale
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
HAISSINSKY	T	Radiochimie
LEMEE	T	Physiologie B.M.P.V.
GUERIN	T	Chimie M.P.C.

SECRETAIRE GENERAL C. MONIER

A ma mère

LE BENZO-3,4 PYRENE PYROFORME DANS LES PRODUITS
DE COMBUSTION DE LA CIGARETTE. DETECTION, DOSAGE,
RECHERCHE DES FACTEURS D'INHIBITION.

par

Michel HUBERT-HABART

Attaché de Recherches à l'INH
Assistant au laboratoire de Chimie Organique
de la Fondation Curie - Institut du Radium

Ce travail a été réalisé à l'Institut du Radium-Fondation Curie.

Monsieur le Dr Raymond LATARJET, directeur, a pris l'initiative de ces recherches. Il en a assuré la direction et la coordination. Je tiens à lui exprimer ici ma déférente gratitude et à lui témoigner la fierté que j'éprouve à travailler sous sa direction bienveillante et éclairée.

Je remercie Monsieur le Professeur BUGNARD, président du groupe d'Etudes de la Fumée de Tabac, d'avoir bien voulu m'accepter parmi son personnel à l'Institut National d'Hygiène.

La réalisation de ce travail a été rendue possible grâce aux subventions du SEITA gérées par l'Institut National d'Hygiène. Je suis heureux de témoigner ma reconnaissance à Monsieur GRIMANELLI, directeur général du SEITA, non seulement pour cet appui matériel mais aussi pour l'intérêt personnel qu'il n'a cessé de manifester à l'évolution de ces études.

Monsieur J. CUZIN, ingénieur en chef des Manufactures de l'état, Directeur du Service des Laboratoires du SEITA, m'a procuré de nombreux échantillons de goudrons; il a confronté les résultats de ses propres déterminations avec les nôtres et a contribué à leur interprétation grâce à sa grande compétence en ces questions. Qu'il trouve ici l'expression de la sympathie née de cette amicale collaboration. J'associe

ses collaborateurs à mes remerciements.

Monsieur René ROYER, Chef du laboratoire de chimie organique de la Fondation Curie, chargé de recherches au C.N.R.S., a continuellement participé à ces recherches, dont il a orienté l'évolution pratique. Ce travail m'est une occasion nouvelle de lui manifester, ma confiance et ma reconnaissance pour avoir suscité ma vocation scientifique et assuré ma formation de chimiste organicien.

La partie spectrophotométrique de ce travail a été réalisée en collaboration étroite avec Monsieur Bernard MUEL, assistant au laboratoire Pasteur de l'Institut du Radium. Je le remercie très amicalement pour la part importante qu'il a prise à l'élaboration de cette thèse. Que Mademoiselle Geneviève LACROIX et Monsieur Bernard GARMIRIAN, actifs collaborateurs de Monsieur MUEL, soient associés à ces remerciements.

Monsieur le Professeur Paul RUMPF, Sous-Directeur du Centre d'Etudes et de Recherches de Chimie Organique Appliquée a bien voulu accepter la charge de Directeur de thèse et de Rapporteur auprès de la Faculté des Sciences. Je l'assure de ma reconnaissance la plus sincère pour les précieux conseils qu'il m'a donnés lors de la mise au point de ce travail.

Je tiens à assurer Monsieur le Professeur Charles PREVOST de ma très respectueuse gratitude pour l'honneur qu'il m'a fait en voulant bien accepter la présidence du jury d'examen. Je remercie très vivement Monsieur le Professeur Raymond DAUDEL tant pour l'aide qu'il m'a apportée au

cours de mes études scientifiques que pour l'intérêt qu'il a manifesté au présent travail en acceptant de faire partie du jury.

Que Monsieur le Docteur Jean COURTIAL, Directeur de la Fondation Curie trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour sa bienveillance et pour l'aide matérielle qu'il m'a si généreusement apportée au début de ma carrière scientifique.

Je suis heureux de manifester ma gratitude à Madame BAZILE qui a facilité la réalisation pratique de ce travail en assurant la liaison administrative entre la Fondation Curie et l'Institut National d'Hygiène;

à Monsieur Jean VONS, chargé du service photographique de la Fondation Curie qui a réalisé les photographies incluses dans cette thèse; à tous mes camarades de laboratoires, Mademoiselle HUDRY, Messieurs BISAGNI et DEMERSEMAN, assistants à la Fondation Curie;

à Monsieur Bernard EKERT, Assistant à la Fondation Curie, pour l'aide qu'il m'a apportée dans certaines parties de mon travail et pour l'amitié qu'il m'a toujours manifestée;

à Madame PICHET pour le soin qu'elle a apporté à préparer le matériel nécessaire à mes expériences.

Depuis la découverte, en 1915, de l'action cancérigène du goudron de houille, l'influence de produits alimentaires ou industriels sur l'initiation ou le développement du cancer suscite des travaux de plus en plus nombreux. L'usage de fumer le tabac, sous forme de cigarettes et cigares ou dans la pipe, constitue sans doute l'un des facteurs les plus étudiés parmi ceux qui seraient susceptibles de jouer un rôle dans la progression de cette maladie.

Depuis 1939, de nombreuses enquêtes statistiques (1 à 9) tendent à établir des relations étroites entre l'augmentation de la fréquence du cancer pulmonaire et l'accroissement de la consommation de cigarettes. D'autres informations conduisent même à penser que l'abus du tabac pourrait induire certaines tumeurs du tractus digestif (x) (10). Alertée par la presse, l'opinion publique a pris conscience d'un incontestable danger. Les organismes producteurs et distributeurs de tabac, Régies nationales ou Entreprises privées, se sont émus de l'accusation de "vendre du cancer" et ont réagi - avec un louable souci d'objectivité - en suscitant ou en favorisant des recherches approfondies sur la production, la composition et les effets biologiques des produits de combustion du tabac. Un vaste effort de nombreux laboratoires de cancérologie répondit, dans le monde entier, à cette sollicitation.

(x) L'action de la fumée de tabac sur le système cardiovasculaire ne sera pas envisagée dans ce travail.

En matière de pathogénie spécifique du tabagisme, la recherche doit non seulement surmonter les nombreuses difficultés techniques inhérentes à la complexité des substances étudiées et à l'incertitude des méthodes analytiques utilisées mais aussi dégager une ligne scientifique dans l'intrication d'intérêts contradictoires qui troublent trop souvent la sérénité des laboratoires.

Dès leur parution, les publications consacrées aux relations de causalité tabac-cancer déchaînèrent de multiples controverses, certains "spécialistes" infirmant ces premiers résultats, d'autres les minimisant. Mais l'accumulation et la qualité des études statistiques établies depuis dans divers pays, semblent avoir maintenant rallié définitivement toutes les opinions à l'évidence d'un risque certain . Le caractère spécifique de l'information d'origine statistique, qui tend à suggérer la plausibilité d'une interprétation causale sans pouvoir, par nature, en administrer la preuve, appelle cependant des vérifications expérimentales, en laboratoire. De nombreuses recherches furent alors entreprises dans les voies suivantes :

1^o) Détermination des facteurs mécaniques, physico-chimiques et chimiques qui interviennent dans la combustion de la cigarette;

2^o) Production continue des goudrons formés par la combustion du tabac dans des appareils constituant des "mo-

dèles", aussi fidèles que possible, du "fumeur humain";

3°) Fractionnement et analyse, qualitative et quantitative, des goudrons pyro-formés;

4°) Etudes des éventuelles propriétés cancérigènes de chaque groupe de substances ou, au mieux, de chaque composé défini, isolés des produits de la combustion du tabac. A ce niveau d'expérimentation, la mise au point de tests rapides - in vitro ou in vivo - devient souhaitable;

5°) Recherches tendant à la mise au point d'une cigarette de "sécurité" (sécurité relative). Ce dernier aspect du problème devrait être l'aboutissement de toutes les recherches antérieures et permettre d'instaurer une véritable prophylaxie de la cancérisation des voies pulmonaires, sous l'aspect des implications tabagiques.

Du point de vue chimique, les premières expérimentations consistèrent essentiellement en l'analyse plus ou moins détaillée de goudrons de cigarettes, issus de machines reproduisant au mieux les conditions de consommation par l'homme. Les recherches étaient particulièrement orientées vers la détection de composés déjà connus pour leur pouvoir cancérigène, dont la présence aurait étayé les résultats des statistiques. L'existence dans la fraction neutre de ces goudrons, d'hydrocarbures polycycliques condensés - notamment du benzo-3,4 pyrène, dont les propriétés cancérigènes ne font aucun doute - fut signalée par divers auteurs (11 à 13).

Simultanément l'étude biologique de ces goudrons, in toto ou après fractionnement, permit à Raffo puis à Winder et à ses collaborateurs (2,14) d'obtenir chez la souris les premiers cancers expérimentaux d'origine tabagique. Cependant ces résultats biologiques difficiles à reproduire ne furent pas considérés comme satisfaisants. Sur le plan chimique, de multiples contestations tendaient à incriminer la valeur des détections spectroscopiques utilisées, particulièrement en ce qui concerne leur spécificité;

Cependant, de nombreux travaux (15) permirent l'identification dans les goudrons de cigarettes d'un grand nombre de composés de structures très diverses parmi lesquels nous citerons : 46 acides, 37 bases, 13 phénols, 11 alcools ou polyols, 10 aldéhydes, 9 esters, 8 cétones, 7 hétérocycles oxygénés et 28 autres composés. La catégorie des hydrocarbures - dans le groupe duquel se placent les molécules les plus cancérigènes connues - retint particulièrement l'attention. On montra ainsi la présence de 74 molécules hydrocarbonées réparties de la façon suivante : 21 hydrocarbures alicycliques dont 9 saturés, 10 éthyléniques et 2 acétyléniques, et 53 hydrocarbures à cycles aromatiques accolés dont :

5 à 1 cycle

4 à 2 cycles

10 à 3 cycles

15 à 4 cycles

10 à 5 cycles

8 à 6 cycles

1 à 7 cycles.

Si aucune des molécules isolées jusqu'ici à partir des fractions acide et basique ne peut rendre compte d'un éventuel pouvoir oncogène du goudron de tabac, il n'en est pas de même de la fraction neutre, où quelques hydrocarbures polycycliques détectés sont connus pour leurs propriétés cancérigènes. C'est le cas des composés suivants :

Benzo -3,4 pyrène (++++) (x);

Dibenzo -3,4 ; 9,10 pyrène (++++) ;

Diméthylchrysène (++) ;

Cyclopenténo -5,6 benzo -1,2 anthracène (+) ;

Dibenzo -1,2 ; 7,8 fluorène (+) ;

Méthyl -5 benzo -1,2 anthracène (+).

Parmi ces dérivés, le benzo -3,4 pyrène est le plus intéressant du fait de sa grande activité oncogène et de sa relative abondance dans les goudrons. Son degré d'annellation moyen permet en outre de le considérer comme un représentant caractéristique des molécules formées par pyropolycondensation.

Toutefois la présence du benzo -3,4 pyrène dans les condensats de fumée de cigarettes ne peut être considéré comme la preuve de l'action cancérigène de ces condensats

(x) Le nombre de + définit l'indice de carcinogénicité selon A. et B. Pullmann, "Cancérisation par les substances chimiques et structure moléculaire", Masson et Cie, Editeurs.

pour l'épithélium bronchique. On sait, en effet, que les agents chimiques provoquent la cancérisation de tissus particuliers dans des conditions d'application déterminées. Les hydrocarbures polycycliques tels que le benzo -3,4 pyrène exercent leur effet par badigeonnage en solution acétonique sur la peau de souris ou par injection. Pour des raisons évidentes, il n'a pas été établi expérimentalement que ces produits puissent induire le même type de cancer chez l'homme. Cependant, le cancer du crotum provoqué par la suie (16), le cancer épidermique des goudronneurs (17,18) et bien d'autres données étiologiques du même type montrent bien la relation causale qui existe chez l'homme entre le badigeonnage avec un produit riche en benzo pyrène et la cancérisation. On ignore cependant si l'hydrocarbure transporté par la fumée provoquera une cancérisation bronchique. Jusqu'à présent aucune expérience significative n'a pu être réalisée chez l'animal, en particulier le rat, pour prouver l'action cancérigène des goudrons de tabac au niveau pulmonaire. Si certains auteurs ont provoqué la formation de cancers sur la peau de souris, par application de goudrons de tabacs, tous les essais de cancérisation des voies respiratoires par inhalation ou inclusion de ces goudrons sont restés sans résultats ou, tout au moins, n'ont pas donné d'indications décisives.

Jusqu'ici, seules les statistiques permettent d'établir une corrélation significative entre l'augmentation des

produits tabagiques (cigarettes surtout) et l'accroissement de l'incidence relative de la cancérisation bronchique primitive.

La convergence des données expérimentales fournies par l'application directe sur animaux, et des résultats analytiques mettant en évidence l'existence, parmi les constituants chimiques de la fumée, de composés cancérigènes, autorise à admettre que la liaison corrélationnelle ainsi établie par les enquêtes statistiques possède la signification fondamentale d'une liaison de cause à effet.

Le présent travail eut pour premier objectif de démontrer d'une manière incontestable, la présence du benzo -3,4 pyrène dans les goudrons de combustion des cigarettes françaises. Par traitement chimique approprié de ces goudrons, séparation chromatographique des extraits sélectionnés et analyse systématique en spectrophotométrie de fluorescence et d'absorption ultra-violette, nous avons pu confirmer la présence de cet hydrocarbure polycyclique dans les produits de combustion du papier à cigarettes et du tabac. Nous avons ainsi défini une méthode standard pour sa détection dans des mélanges complexes.

Dans une deuxième étape, nous avons essayé de préciser la valeur quantitative des dosages effectués jusqu'alors par des techniques différentes de la nôtre et de préciser la signification de nos propres mesures. La complexité des mélanges

étudiés, la diversité des opérations chimiques et chromatographiques qu'implique leur fractionnement, l'imprécision des dosages spectrophotométriques en absorption UV laissaient planer une certaine suspicion sur le degré de signification des résultats donnés par différents auteurs. Des variations, parfois importantes, dans la valeur relative de ces résultats demandaient de définir le coefficient d'erreur qui pouvait les entacher. Un système de surcharge de nos extraits par des quantités connues de benzo -3,4 pyrène, nous a permis d'évaluer l'importance des erreurs de dosage et, en partie, de déterminer un certain nombre de facteurs pouvant être considérés comme responsables de ces erreurs.

Simultanément, nous nous sommes efforcés de mettre au point une méthode plus rapide pour la détection du benzo-3,4 pyrène. En utilisant la spectrophotométrie de fluorescence à basse température, nous avons pu déterminer directement les spectres de solutions octaniques des goudrons de la combustion tabagique et détecter d'une façon certaine la présence de cet hydrocarbure, sans qu'aucun traitement préalable de purification soit nécessaire. Bien que cette technique nécessite des manipulations plus délicates pour l'enregistrement des spectres, elle s'avère d'une sensibilité telle qu'elle mérite d'être retenue comme méthode d'application générale. Elle donne une réponse rapide quant à la présence éventuelle du benzo -3,4 pyrène dans un pyrolysat quelconque. Malheureu-

sement, dans cet état de complexité chimique où la détection qualitative reste possible à effectuer avec sécurité, un dosage ne peut être que chimérique et il faut passer par les opérations normales de séparation et de purification pour obtenir une précision satisfaisante du dosage.

Nos techniques d'analyse qualitative et quantitative furent appliquées aux produits de combustion de divers matériels, notamment à ceux des différents types de papier à cigarettes du commerce. Notre attention fut en effet retenue par l'opinion de certains auteurs, qui attribuaient au seul papier la responsabilité de la pyroformation des hydrocarbures cancérigènes à partir de la cigarette totale. Ce point de vue semblait assez bien concorder avec les résultats de nos premières expériences où la combustion du papier à cigarettes provoquait la formation d'une quantité de benzo -3,4 pyrène bien supérieure à celle donnée par un poids égal de cigarettes entières.

D'autres résultats furent alors publiés (19-20) qui démontraient la présence de benzo -3,4 pyrène dans les condensats de fumées de cigares et de pipes. Les opinions contradictoires suscitées par ces résultats nous incitèrent à effectuer un examen plus approfondi du phénomène de pyroformation des hydrocarbures polycycliques condensés. Nous avons adopté pour cela un système de combustion, facilement applicable à un matériel de complexité limitée et qui permettait

l'obtention rapide d'un goudron riche en benzo -3,4 pyrène. La combustion du papier à cigarettes, entassé dans une cheminée en pyrex, comme Alvord et Cardon l'ont préconisé, nous offrit un modèle pratique et simple pour la réalisation d'expériences en série. Les résultats de ces combustions expérimentales et les rapprochements qu'ils suggéraient avec ceux publiés en Angleterre et aux Etats-Unis, nous permirent une meilleure compréhension du mécanisme de la pyropolycondensation.

L'interprétation de toutes les observations effectuées jusqu'alors, nous permit de définir les conditions indispensables à la pyroformation des hydrocarbures cancérigènes :

1^o) Présence de matières organiques ;

2^o) Gradient thermique défini entre 400 et 1200°
(21,22) ;

3^o) Tension partielle d'oxygène correspondant à un certain caractère anoxique de la combustion.

En possession d'une méthode éprouvée pour le dosage du benzo -3,4 pyrène et d'un procédé commode pour réaliser des combustions en série, nous nous sommes alors attachés à l'étude des facteurs chimiques qui pourraient être susceptibles de supprimer ou de diminuer la pyroformation des hydrocarbures polycycliques.

Sur la cigarette, cette intervention pouvait être envisagée théoriquement de trois façons :

1^o) Elimination du ou des composés de départ, qui au cours de la combustion de la cigarette conduisent à la formation des dérivés polycondensés. Par un système d'extraction adéquat, ou par lavage sélectif des feuilles de tabac ou du tabac à consommer, on pouvait espérer obtenir une cigarette inoffensive. Pratiquement quelques essais furent tentés dans cette voie, notamment aux Etats-Unis où certains auteurs (23), par lavage chloroformique des feuilles de tabac, pensaient supprimer l'apparition des hydrocarbures cancérogènes en éliminant les parafines considérées comme responsables de leur pyroformation. Malheureusement toutes ces tentatives se révélèrent infructueuses. La diversité des matériels susceptibles de produire des hydrocarbures et entrant dans la constitution de la cigarette, ne semble pas permettre une sélection suffisamment efficace pour présenter un intérêt pratique. Il faut cependant attendre le résultat de travaux en cours visant à l'élimination de produits définis - en particulier des acides gras - qui pourraient jouer le rôle de précurseurs spécifiques de la pyroformation des hydrocarbures.

2^o) Purification de la fumée, par l'emploi de filtres sélectifs placés à l'extrémité de la cigarette.

Cette solution est probablement la plus tentante parce que d'application plus immédiate. Elle n'entraînerait aucune transformation dans les procédés courants de fabrication

et de conditionnement de la cigarette, et consisterait en la simple adjonction d'un piège à hydrocarbures.

En dépit des nombreux essais qui ont été tentés jusqu'ici et malgré une publicité plus ou moins heureuse étalée à propos de certaines nouveautés, aucune réalisation valable n'est encore apparue dans ce domaine, à notre connaissance. Nous mêmes avons effectué quelques expériences en ce sens, mais nos filtrations ne se sont guère révélées plus sélectives que toutes celles abordées jusqu'ici. Ces échecs ne semblent pas devoir être imputés à un choix malheureux de l'agent de filtration, mais sont dus vraisemblablement à la structure corpusculaire de la fumée. Cet aspect structural de la fumée a été mis en évidence par des études de micrographie électronique (24). Or, si l'habitude de fumer représente une véritable toxicomanie mineure et si l'on admet que le fumeur doit recevoir sa ration quotidienne d'alcaloïdes, le problème de la protection bronchique consiste à retenir sélectivement les composés polycycliques et en particulier, les cancérigènes, tout en laissant libre passage aux substances euphorisantes. Aucun des filtres étudiés jusqu'ici (25 à 28) n'a permis d'opérer une telle distinction entre les diverses séries des composés chimiques pyroformés. La filtration agit en effet par effet d'absorption plutôt que par effet de fixation chimique.

3°) Intervention dans le schéma réactionnel qui conduit à la formation des composés cancérigènes.

A priori, on peut envisager une telle intervention soit

en modifiant la température de combustion, soit en changeant les conditions de la combustion, par une action chimique déterminée. C'est dans cette seconde voie que nous avons poursuivi nos expériences. Nous avons réalisé dans notre appareillage d'étude expérimentale la combustion d'un même papier à cigarettes, ayant subi au préalable des charges chimiques d'origine et d'importance variées. Les dosages correspondants aux divers échantillons nous indiquaient l'influence de ces additifs sur le taux de formation du benzo-pyrène. Ainsi, nous avons pu dresser une liste d'inhibiteurs chimiques de la pyroformation des hydrocarbures polycycliques condensés, et étudier pour certains de ces additifs l'intensité de leur action en fonction de leur concentration dans la masse de papier. Nous avons proposé une interprétation théorique de cette action. Nous avons essayé d'en réaliser l'application à la cigarette totale.

Utilisant des cigarettes, constituées par un papier préalablement traité chimiquement, et par du tabac ordinaire, nous avons montré l'impossibilité au moins provisoire de réaliser une inhibition de la pyroformation des hydrocarbures polycycliques cancérigènes dans la cigarette par le seul traitement du papier. Nous retrouvions en effet dans les goudrons de cigarettes ainsi traitées une quantité de benzo -3,4 pyrène égale à celle détectée dans les goudrons de combustion d'un nombre égal de cigarettes courantes.

La surcharge chimique du papier nous plaçait dans des conditions favorables à une élimination de la fraction d'hydrocarbures polycycliques éventuellement apportés par le papier. Nos expériences en ce domaine nous amenèrent à dégager la responsabilité du papier dans la pyroformation des hydrocarbures condensés.

La réalisation d'une inhibition chimique efficace implique donc d'effectuer une surcharge chimique au sein même de la cigarette. La confection de telles cigarettes soulève des problèmes pratiques de fabrication et fait intervenir des facteurs qui dépassent les frontières d'une étude théorique.

Nous ne pensons pas qu'il nous appartienne de définir dans le détail les applications d'un principe d'inhibition que nous avons établi théoriquement, sur les bases d'expériences de laboratoire. On peut toutefois espérer qu'il servira pour une application adaptée aux impératifs de l'industrie et aux besoins réels du fumeur.

Les problèmes expérimentaux que pose l'analyse des goudrons de tabac se retrouvent, dans des termes à peu près équivalents pour les produits d'un grand nombre de combustions industrielles et ménagères. La portée des méthodes que nous avons mises au point dépasse donc largement le cadre de l'application particulière que nous en avons faite.

Nous exposerons nos résultats dans l'ordre chronologique, tout en essayant de tracer la ligne logique qui a guidé la mise en oeuvre de nos expériences et en évoquant les apports étrangers qui ont facilité la réalisation de notre travail. Nous examinerons enfin les difficultés qui ont empêché ou limité la réalisation d'expériences dont l'intérêt théorique semblait évident.

P R E M I E R E P A R T I E

Détection du benzo-3,4 pyrène dans les goudrons

Le benzo-3,4 pyrène fut identifié pour la première fois en 1932 par COOK et ses collaborateurs (29), qui l'isolèrent du goudron de houille. Les mêmes auteurs démontrèrent les fortes propriétés cancérigènes de cet hydrocarbure. Cette découverte devait ouvrir le grand chapitre de la chimio-cancérogénèse expérimentale et permit d'attribuer à quelques molécules bien définies les propriétés oncogènes de nombreux produits industriels.

De nombreux travaux furent consacrés à ce représentant type des "hydrocarbures cancérigènes" qu'est le benzo-3,4 pyrène. Sa synthèse fut bientôt effectuée et ses propriétés physiques, chimiques et biologiques déterminées avec précision. Sa fluorescence marquée qui servit à son identification dans les goudrons, fut mieux définie et ses spectres de fluorescence (30) et d'absorption établis.

La mise au point d'une méthode de détection directe et rapide du benzo-3,4 pyrène dans des mélanges aussi complexes que les goudrons formés par combustion des cigarettes soulevait de très nombreuses difficultés. Un grand nombre de composés, de constitutions très diverses - sucres, sels minéraux, amines, alcaloïdes ... - ont pu être décelés dans le tabac. Il était illusoire de vouloir donner un schéma chimi-

que cohérent de la combustion d'un tel mélange, effectuée vers 800° et où de nombreuses réactions de pyrodécomposition interfèrent avec des processus de polycondensation non moins variés. A priori, la seule méthode accessible consistait en l'analyse des produits terminaux les plus stables formés au cours de cette combustion. A ce niveau, le recours aux techniques les plus fines de la séparation chromatographique et du dosage spectrophotométrique devait permettre une détermination valable. Cependant, la complexité du mélange étudié doit être réduite, au préalable, par un traitement chimique approprié.

Les goudrons bruts sont mis en solution acétonique. Une série de lavages acides et basiques permettent l'élimination de deux importantes fractions constituées par des substances azotées, d'une part, et par des composés phénoliques ou acides, d'autre part. On réalise ainsi un éclaircissement notable de l'extrait qui ne contient plus que les produits neutres - dont les hydrocarbures - issus de la combustion.

A ce stade du traitement, certains auteurs ont déjà tenté une séparation des hydrocarbures, soit par précipitation fractionnée, soit par complexation sélective, par exemple sous forme de picrates ou de tétrachlorophthalates (31 à 33). Les méthodes d'insolubilisation ne sont guère rentables étant donné les très petites quantités d'hydrocarbures à dé-

celer dans des volumes importants de solution, d'une part, et l'impossibilité de fixer un partage favorable entre les différents solvants mis en présence, d'autre part. Quant aux méthodes de complexation, elles ont pu donner certains résultats dans le seul cas de la formation des picrates, mais au prix d'une perte importante en hydrocarbures ainsi séparés (32).

La purification de l'extrait neutre des goudrons a été parfois réalisée - d'une manière très empirique - par passage sur un absorbant chimique comme le chlorure de zinc (31). Selon la nature de l'hydrocarbure que l'on envisage de séparer, on peut également instaurer une sélection chimique du mélange. C'est ainsi que Bonnet et Neukomm (31) font précéder la recherche du dibenzo-3,4; 9,10 pyrène d'une attaque oxydative au chlorure ferrique des autres hydrocarbures moins condensés ou des substances polymérisées de la fraction neutre.

En ce qui nous concerne, nous avons limité notre traitement chimique à l'isolement de cette fraction neutre. En effet, a priori nous ne voulions pas prendre le risque de perdre une certaine quantité des hydrocarbures ou de léser leur structure chimique au cours de manipulations préalables trop compliquées. Nous envisagions surtout la mise au point d'une méthode dont la simplicité d'application serait compatible avec une précision suffisante. Au demeurant la grande

sensibilité de l'appareillage spectroscopique dont nous avons l'usage et la fluorescence très marquée (34) du benzo-3,4 pyrène nous permettaient d'envisager un fractionnement suffisamment sélectif au cours des chromatographies ultérieures.

En effet, dès la première chromatographie la lecture des spectres de fluorescence permet de procéder à une sélection des échantillons élués. Il faut noter qu'à ce niveau de séparation, la détermination spectroscopique doit être effectuée à basse température (à -180°). On sait, en effet, que dans ces conditions, les spectres des hydrocarbures sont fortement exaltés et que celui du benzo-3,4 pyrène, particulièrement intense, ressortira davantage. On réalise ensuite une série de nouvelles chromatographies, en faisant varier les mélanges d'élution, la nature du support de fixation, la vitesse d'élution etc ... Progressivement, les indications très sensibles du spectre de fluorescence à basse température tendent à concorder avec celle du même spectre établi sur un échantillon de référence. Finalement, on confirme cette identification en spectroscopie d'absorption et de fluorescence à la température ambiante. On peut alors opérer un dosage dont nous préciserons la signification plus loin.

Etude spectrographique. Matériel et procédé.

I^o) En fluorescence.

A/ A la température ambiante. Des spectres de fluorescence précis et détaillés ont été obtenus par enregistrement photo-électrique direct grâce à un récepteur de très haute sensibilité et à un monochromateur double de grandes dimensions, réalisant un compromis satisfaisant entre les deux exigences antagonistes que sont la luminosité et la dispersion.

Ce dispositif offre deux grands avantages sur la spectrographie photographique :

- La brièveté des poses, qui évite les altérations, en cours d'examen, de la substance étudiée, par le rayonnement ultraviolet excitateur, et qui permet d'effectuer de multiples contrôles au cours des chromatographies;

- L'obtention immédiate du spectre réel, une fois connue la courbe spectrale de sensibilité du dispositif spectrophotométrique, sans avoir à passer par les opérations laborieuses de la photométrie photographique.

L'appareil dispersif est un monochromateur double du type soustractif, construit par l'Institut d'Optique de Paris (35). Il est ouvert à $f/10$, comporte deux prismes de flint (angle 60° , hauteur 6 cm, base 10 cm) et une optique à miroirs. La dispersion atteint $30 \text{ \AA/mm}$ à $4000 \text{ \AA}$, ce qui, avec des fentes de 0,1 mm, permet des pointages de l'ordre

de $3 \text{ \AA}$. Par exemple, nous séparons aisément deux bandes distantes de $10 \text{ \AA}$ à $4300 \text{ \AA}$.

Le récepteur est un photomultiplicateur (type 6685 B de la firme E.M.I.) à 14 étages, très sensible dans la région spectrale explorée et dont le courant d'obscurité est inférieur à 10^{-8} Amp. pour un gain de 10^7 fois. Il est directement relié à un galvanomètre.

La fluorescence de l'échantillon est excitée par la radiation $3.650 \text{ \AA}$ issue d'un arc à vapeur de mercure à pression moyenne (Mazda M.A. 125), et isolée par un filtre ultraviolet de 4 millimètres d'épaisseur. Cette radiation est concentrée sur l'échantillon par un miroir parabolique au sommet duquel est ménagée une ouverture par laquelle passe la lumière de fluorescence qu'une lentille focalise sur la fente d'entrée du monochromateur. La fluorescence est ainsi excitée et observée sur la même face de la cuve, ce qui évite les inconvénients éventuels d'absorption de la lumière de fluorescence par la solution elle-même.

Tous les spectres que nous mentionnerons dans ce travail sont les spectres vrais, c'est-à-dire que les indications du récepteur ont été corrigées d'après la sensibilité spectrale monochromatique du dispositif. Celle-ci dépend des variations spectrales de la transmission et de la dispersion du monochromateur, et de la sensibilité du photomultiplicateur. Ces variables avaient été déterminées séparément, et

finally controlled by means of a known spectral emission source, namely a tungsten filament whose color temperature had been determined by the optical pyrometer.

The figure 1 gives the principle scheme of the spectroscopic apparatus that we used.

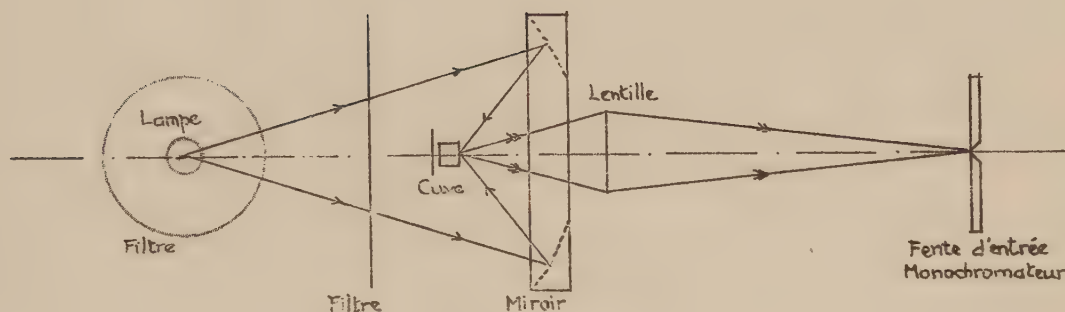


Fig. 1 - Schéma de principe de l'appareil de fluorescence.

Spectre de référence du benzo-3,4 pyrène (fig.2).

This spectrum was recorded on the commercial Eastman Kodak product that we purified by two chromatographies

successives, la première sur alumine, la seconde sur silice.
Il présente cinq bandes caractéristiques de fluorescence

à : 3950
4036
4087
4267 ₀
4540 Å

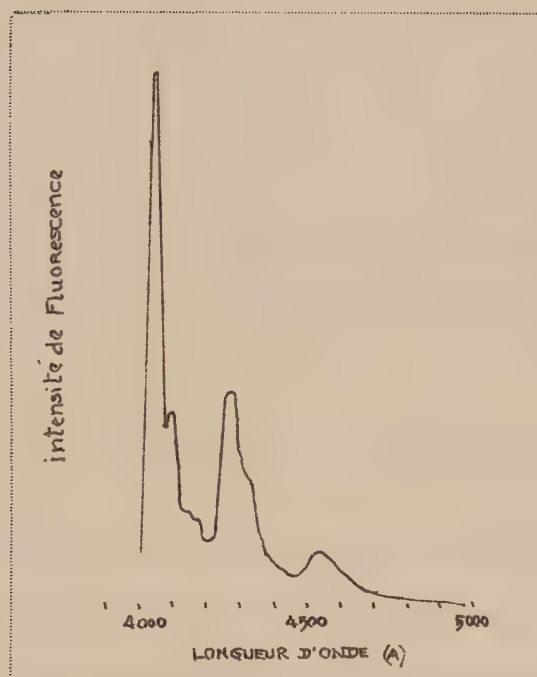


Fig. 2 - Spectre de fluorescence du benzo-3,4 pyrène, vers 20°

A titre d'indication sur la précision des pointés et sur la sensibilité de la méthode, nous donnons en regard (fig.3) le spectre de fluorescence d'un isomère, le benzo-1,2 pyrène préalablement identifié par son spectre d'absorption UV.

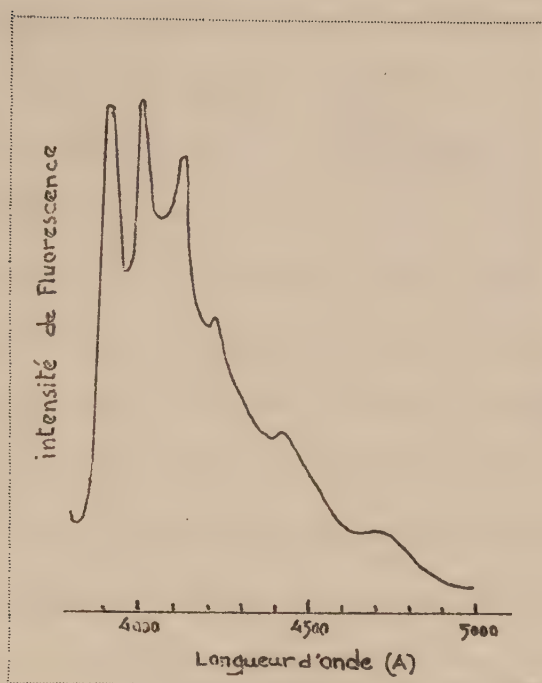


Fig.3 - Spectre de fluorescence du benzo-1,2 pyrène.

Afin d'illustrer la finesse de cette méthode de détection spectroscopique des composés polycycliques, nous l'avons appliquée à la séparation d'un mélange de benzo-3,4 pyrène et de dibenzo-3,4; 9,10 pyrène. Nous avons, pour cela, déterminé le spectre de fluorescence de ce dernier hydrocarbure qui est actuellement considéré comme le produit le plus cancérigène connu (36), en application épidermique ou en injection, et dont la présence a été décelée dans les goudrons de cigarettes (31).

La figure 4 donne le spectre de fluorescence de cet hydrocarbure dissout à la concentration de $1 \text{ } \mu\text{g}$ par cm^3 dans du cyclohexane. Les bandes caractéristiques sont les suivantes

Maximums : 4317 - 4467 - 4590 - 4757 - 4906 - 5250

Epaulements : 4200 - 4370 - 4540 - 4640 - 4950.

Nous avons soumis le dibenzo-3,4; 9,10 pyrène à une chromatographie sur alumine. Les éluats benzéniques les plus fluorescents ont été évaporés puis repris par du cyclohexane. On retrouvait dans le spectre de fluorescence de cette solution toutes les bandes précédentes aux mêmes longueurs d'onde, avec des intensités relatives inchangées, mais on constatait un léger relèvement des parties basses du spectre attribué aux impuretés fluorescentes contenues dans le benzène utilisé pour l'élution. Pour éliminer l'hypothèse que ce relèvement pourrait être dû à une destruction partielle du dibenzo-3,4; 9,10 pyrène, au cours de la chromatographie, nous avons vérifié la stabilité de cette substance en solution dans un mélange de benzène et de cyclohexane, ainsi qu'absorbée sur de l'alumine en contact avec le même solvant. Aucun changement dans le spectre de fluorescence n'a été constaté après un abandon d'un mois, sans protection contre la lumière.

Nous avons comparé, dans les mêmes conditions optiques, les intensités des rayonnements de fluorescence émis : 1° à 4 267 Å par une solution de benzo-3,4 pyrène à la concentration de 1 g / cm³ dans du cyclohexane; 2° à 4 317 Å par une solution de dibenzo-3,4; 9,10 pyrène, de même titre dans le même solvant. L'intensité était deux fois plus forte dans le cas du benzo-3,4 pyrène.

Un mélange à parties égales des deux solutions cyclohexaniques précédentes, présente, nettement séparés, tous les maximums de fluorescence de chaque composé. On peut déduire des intensités relatives des bandes qu'il n'y a pas de transfert appréciable d'énergie d'excitation d'un des composés à l'autre.

Cela nous a permis de mettre au point la séparation chromatographique de ces composés, de la façon suivante :

Une solution dans 40 cm³ de cyclohexane pur pour spectroscopie, de 38,4 γ de benzo-3,4 pyrène et 38,4 γ de dibenzo-3,4;9,10 pyrène, a été passée sur une colonne (150 mm x 7 mm) d'alumine desséchée au préalable pendant 24 h à 180°. La fixation des deux hydrocarbures s'est avérée excellente. Les éluations ont été effectuées avec les mélanges successifs de 5 cm³ de benzène pour 95 cm³ de cyclohexane, 10 de benzène pour 90 de cyclohexane etc ..., et finalement avec du benzène pur. Au cours de l'élution nous distinguons nettement sur la colonne l'apparition de deux anneaux de fluorescence, qui correspondent aux deux carbures entraînés à des vitesses différentes, comme l'indique l'analyse spectrale des échantillons d'élution. En effet, nous avons récupéré successivement des éluats non fluorescents, puis une solution ne contenant que du benzo-3,4 pyrène, puis une autre partie non fluorescente et finalement le dibenzo-3,4; 9,10 pyrène.

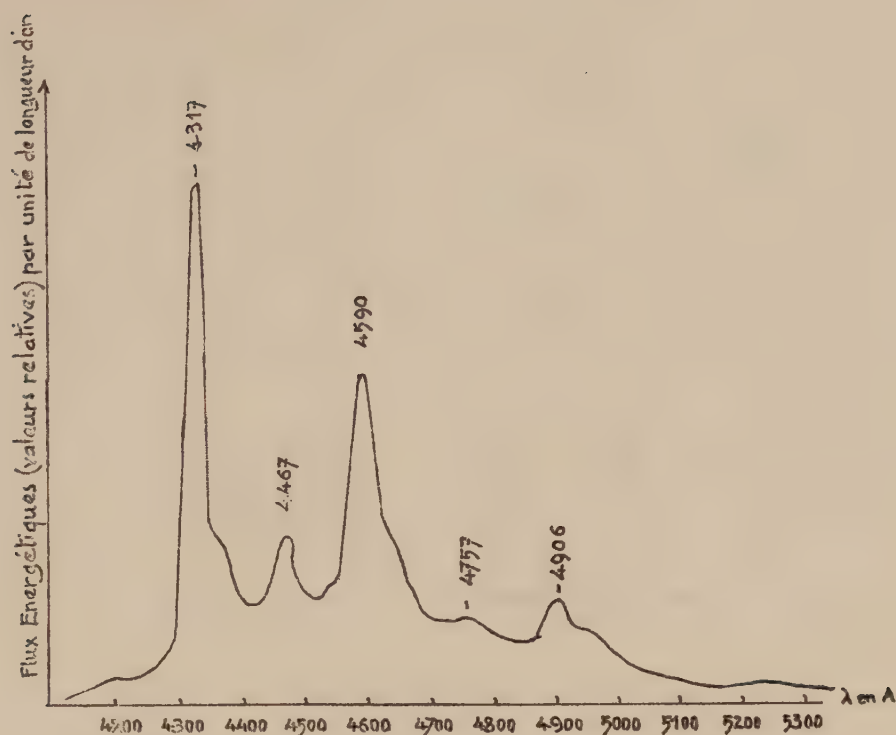


Fig.4 - Spectre de fluorescence du dibenzo-3,4; 9,10 pyrène

B) A basse température.

Des auteurs russes avaient remarqué que le spectre de fluorescence du benzo pyrène en solution dans l'octane à -180° présentait un très grand nombre de bandes particulièrement fines (37). Nous avons précisé les observations de ces auteurs.

Le refroidissement de l'échantillon, précongelé dans une coupelle de cuivre, est assuré par le contact de cette dernière avec une pièce de cuivre dont la partie inférieure

trempe dans de l'azote liquide (fig.5).

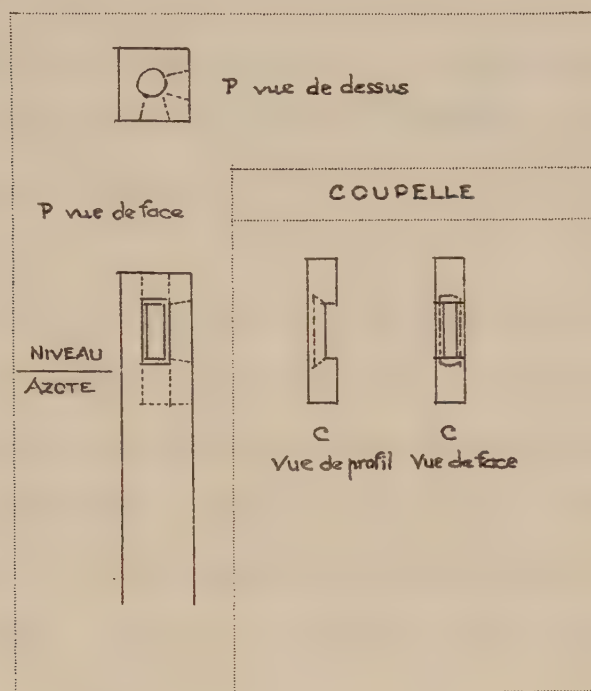


Fig.5 - Support échantillon pour détermination du spectre de fluorescence à basse température.

La température de l'échantillon au cours de l'irradiation est d'environ -180° C. On réalise l'excitation comme à la température ambiante. Le flux excitateur (bande $3650 \text{ \AA}$) issu d'un arc à vapeur de mercure haute pression (Philips S.P. 500), était concentré sur l'échantillon par une lentille de verre. Une deuxième lentille formait une image de l'échantillon sur la fente d'entrée du monochromateur. Le faisceau excitateur et le faisceau issu de l'échantillon en direction du monochromateur, étaient horizontaux et

formaient entre eux un angle de 90° (rayons moyens). Ces faisceaux traversaient la double paroi d'un vase Dewar non argenté, sans pénétrer dans l'azote liquide qu'il contenait.

Le spectre ainsi obtenu présente plus de 50 bandes identifiables. (Toutes les bandes ne sont pas indiquées sur la fig.6).

La richesse de ce spectre en bandes fines et le rendement élevé de la fluorescence lié à l'abaissement de la température permettent la détection de très faibles quantités de benzo-3,4 pyrène (inférieures à $1/10.000$ de χ par cm^3), dans des cas où la détection par fluorescence à température ambiante ou par absorption serait impossible.

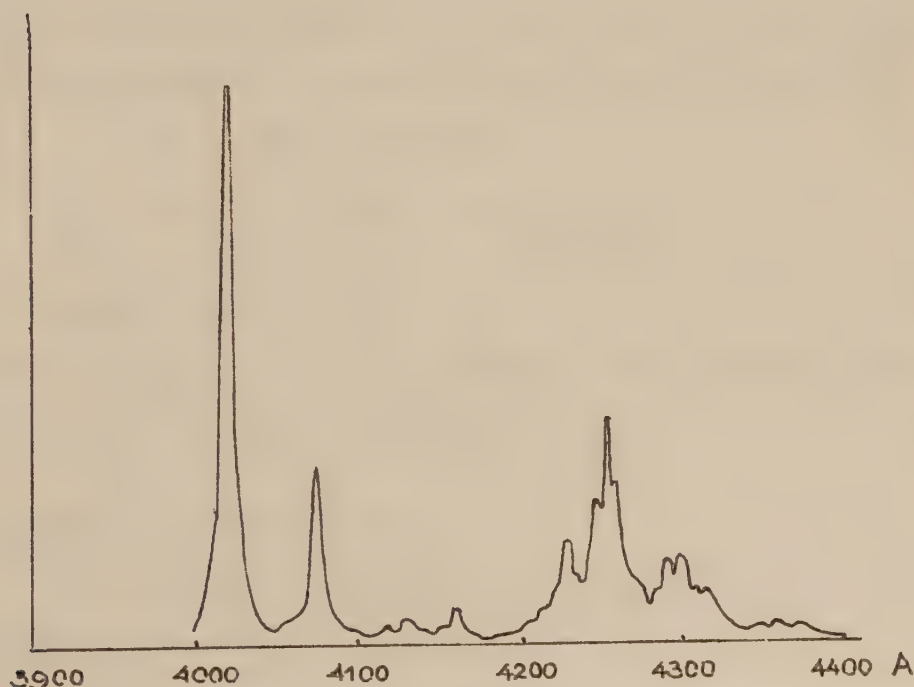


FIG.6 - Spectre de fluorescence du benzo-3,4 pyrène à -180°

Principe du dosage du benzo-3,4 pyrène par son spectre de fluorescence.

1°) A température ambiante.

On emploie une méthode par surcharge, pour éviter les effets d'une réabsorption et d'une inhibition éventuelle de la fluorescence par les substances étrangères.

On compare :

- la hauteur h du pic à $4036 \text{ \AA}$ au-dessus de la droite joignant les points à 4000 et $4070 \text{ \AA}$, pour la solution à doser de concentration x en benzo-3,4 pyrène ;
- La hauteur h' du même pic pour la solution ayant reçu une surcharge de s par cm^3 de benzo-3,4 pyrène.

Si la fluorescence du benzo-3,4 pyrène est proportionnelle à la concentration (ce qui est vrai pour des solutions de l'hydrocarbure pur tant que la concentration est inférieure à 1 par cm^3), on aura :

$$\frac{h'}{h} = \frac{x + s}{x} \quad \text{soit} \quad x = \frac{hs}{h' - h}$$

Pour vérifier le résultat obtenu, on peut utiliser la hauteur du pic à $4036 \text{ \AA}$ au-dessus de la droite joignant les points de la courbe à 4000 et $4125 \text{ \AA}$.

2°) A basse température.

On utilise la bande la plus intense du spectre (à $4030 \text{ \AA}$).

Remarques :

a) On mesure l'émergence du pic de fluorescence au-dessus du fond continu et non la hauteur totale du pic, afin de soustraire la fluorescence due aux substances étrangères.

b) L'addition de cyclohexane et de benzène à l'octane, dans des proportions qui peuvent aller jusqu'à 90 %, ne modifie pratiquement pas le spectre au niveau de la bande utilisée pour le dosage. Nous avons donc effectué les mesures sur les éluats de chromatographie, en ajoutant seulement une certaine proportion d'octane (50 %).

c) Pour tenir compte des éventuelles réabsorption de la fluorescence par la solution elle-même et inhibition de cette fluorescence par des substances étrangères, une méthode de surcharge a été utilisée, comme cela était fait à température ambiante.

d) Entre deux échantillons congelés d'une même solution, il peut y avoir des écarts entre les flux reçus à une certaine longueur d'onde sur le photomultiplicateur (+ 40 %). Ces variations peuvent être dues :

- à des différences de la forme de la surface de l'échantillon, et de la grosseur des cristaux formés par congélation de la solution. (Possibilités d'un effet de déformation de l'image de la lampe d'excitation et d'un effet de diffusion par la masse cristalline).

- à des irrégularités dans le contact entre les solutions congelées et la cuve de cuivre. Cela provoquerait des différences entre les températures des échantillons, ce qui pourrait modifier le flux de fluorescence.

Pour pallier ce phénomène, on doit verser la solution dans la cuve à mi-temps entre le moment de l'immersion partielle de cette cuve dans l'azote liquide et le moment où l'équilibre thermique est atteint.

On remarque, d'autre part, que ces variations sont beaucoup plus importantes (± 100 %) pour des solutions dans l'octane pur.

Cependant on constate que si le flux reçu par le photomultiplicateur à une certaine longueur d'onde peut changer d'un échantillon congelé à l'autre et pour une même solution, les rapports des flux aux différentes longueurs d'ondes varient peu.

Tout se passe donc, comme si la fluorescence ne changeait pas, mais comme si l'on récupérait à chaque fois une fraction variable du flux total émis.

Si à une certaine longueur d'onde λ_0 , l'émission du benzo-3,4 pyrène ajouté en surcharge est négligeable devant l'émission d'une substance étrangère, et que ce benzo pyrène ajouté ne modifie pas la fluorescence émise par ces substances, la réponse du photomultiplicateur doit être la même, à λ_0 , avec l'échantillon non surchargé et l'échantillon sur-

chargé. Dans le cas contraire, on peut rendre les réponses à λ_0 égales pour les échantillons surchargé et non surchargé, en agissant sur la tension d'alimentation du photomultiplicateur. Cela multiplie la réponse du photomultiplicateur par un facteur identique à toutes les longueurs d'onde, et compense la variation dans la fraction du flux récupéré qui s'était produite entre les deux échantillons chargé et non chargé.

A $4005 \text{ \AA}$, le benzo-3,4 pyrène, en solution dans l'octane mélangé à des proportions variables de benzène et de cyclohexane, donne une réponse du photomultiplicateur de $4/1000$ de la réponse à $4030 \text{ \AA}$. Donc à $4005 \text{ \AA}$, la fluorescence des substances étrangères dans la plupart des cas sera beaucoup plus grande que celle du benzo-3,4 pyrène ajouté comme surcharge, même si l'émergence du pic à $4030 \text{ \AA}$ de la solution non surchargée est assez grande par rapport à la fluorescence des impuretés. Si cette approximation n'est pas possible, une correction peut être faite, en négligeant l'influence de l'erreur faite sur l'évaluation de la hauteur du pic.

e) Pour avoir une plus grande précision, nous avons procédé à plusieurs surcharges.

On porte sur un graphique en fonction de la surcharge, l'émergence de la bande à $4030 \text{ \AA}$. Si la fluorescence du benzo-3,4 pyrène est proportionnelle à la concentration, les

différents points (correspondant aux différentes surcharges) doivent être alignés. L'abscisse du point de cette droite à l'ordonnée zéro indique la valeur de la surcharge.

Pour effectuer le dosage nous traçons la droite la plus proche des points obtenus. Nous prenons comme résultat la valeur absolue de l'abscisse de l'intersection de cette droite avec l'axe des surcharges.

L'utilisation de différentes surcharges permet donc, d'une part une amélioration de la précision et, d'autre part, la vérification de la proportionnalité de la fluorescence du benzo-3,4 pyrène à la concentration, dans les conditions de l'expérience.

f) Pour tenir compte des variations qui peuvent se produire au cours du temps (photolyse, changement de température de l'échantillon par baisse du niveau de l'azote liquide, etc ...), les mesures ont été enregistrées autant que possible dans des laps de temps identiques. Le plein d'azote était refait avant chaque enregistrement de spectre et servait de temps zéro.

Technique type utilisée

Soit une solution A contenant environ 1/10 de γ de benzo-3,4 pyrène par cm³.

On prépare les solutions suivantes :

- 1°) 1 cm³ de solution A + 1 cm³ de cyclohexane + 2 cm³ d'octane
- 2°) 1 cm³ de solution A + (1 cm³ d'une solution)
cyclohexanique de 0,05 % de benzo-3,4 pyrène- } + 2 cm³ d'octane
ne par cm³)
- 3°) 1 cm³ de solution A + (1 cm³ d'une solution)
cyclohexanique de 0,1 % de benzo-3,4 pyrène- } + 2 cm³ d'octane
ne par cm³)
- 4°) 1 cm³ de solution A + (1 cm³ d'une solution)
cyclohexanique de 0,2 % de benzo-3,4 pyrène- } + 2 cm³ d'octane
ne par cm³).

On opère ensuite comme suit sur la première solution :

- au temps zéro : Refroidissement préalable de la cuve dans
l'azote liquide et ajustage du niveau d'azote
à un repère sur le support de la cuve;
- à 1 minute 30 : Remplissage de la cuve par la solution avant
que cette cuve soit refroidie à la tempéra-
ture de l'azote;
- à 2 minutes : Mise en place de la cuve quand celle-ci a
atteint la température de l'azote (après
ébullition vive);
- à 3 minutes : Réglage de la position de l'échantillon pour
obtenir le maximum de réponse du photomulti-
plicateur;

de 6 minutes à

15 minutes : Enregistrement du spectre (points 4005, 4015, 4030, 4045) : chaque point est enregistré 4 fois.

A chaque enregistrement la déviation du galvanomètre est réglée à 64 divisions à 4015 Å en agissant sur la tension d'alimentation du photomultiplicateur.

On répète exactement les mêmes opérations pour les solutions 2,3 et 4.

On mesure la hauteur du pic à 4030 Å pour chaque échantillon, au-dessus de la droite joignant les points à 4015 et 4045 Å (soit h_1 , h_2 , h_3 et h_4 ; fig.7).

On porte les hauteurs des pics, sur un graphique, en fonction des surcharges (fig.8).

Si la fluorescence du benzo-3,4 pyrène est proportionnelle à sa concentration, on doit obtenir une droite :

$$h = K (a + s)$$

où h = hauteur de l'émergence du pic

K = coefficient de proportionnalité

s = surcharge par cm^3

a = quantité de benzo-3,4 pyrène par cm^3 de la solution à doser.

L'abscisse pour $h = 0$ est $s = - a$, ce qui donne la valeur de a . On trace la droite la plus proche des points

obtenus (qui s'alignent à $\pm 5 \%$). On prend comme résultat de la concentration de la solution à donner, la valeur absolue de l'abscisse de l'intersection de cette droite avec l'axe des s (surcharges).

Détermination du spectre de phosphorescence du benzo-3,4 pyrène à basse température.

Nous avons enregistré le spectre de phosphorescence du benzo-3,4 pyrène en solution alcoolique à -180° .

La phosphorescence était produite dans un phosphoroscope mécanique (fig.9). Un photomultiplicateur sensible dans le proche infrarouge a permis d'enregistrer le spectre dû à des transitions de l'état premier triplet à l'état fondamental, comme nous l'avons montré dans un travail antérieur (c).

Ce spectre (Fig.10) est formé de 8 bandes assez fines entre 6000 et 10.000 $\text{\AA}$.

Dans un échantillon purifié, obtenu dans un goudron de combustion de papier à cigarettes, les deux bandes les plus intenses de ce spectre ont été retrouvées (fig.11).

Mesure de l'émergence des pics à 4030 Å

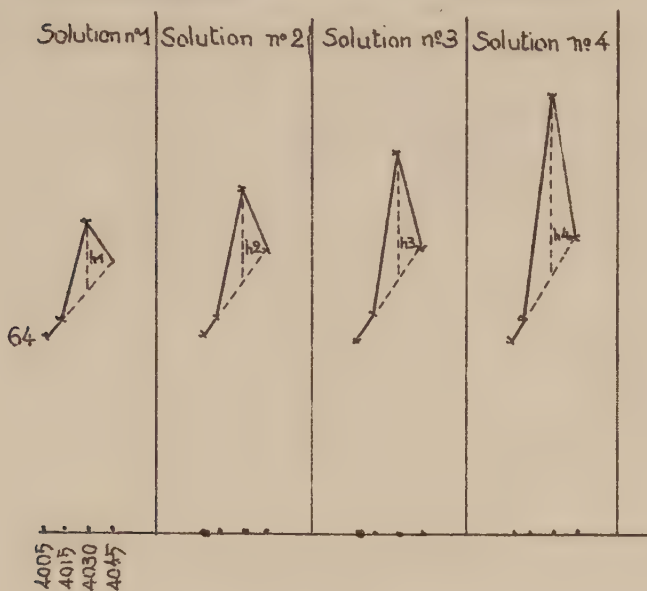


Fig. 7

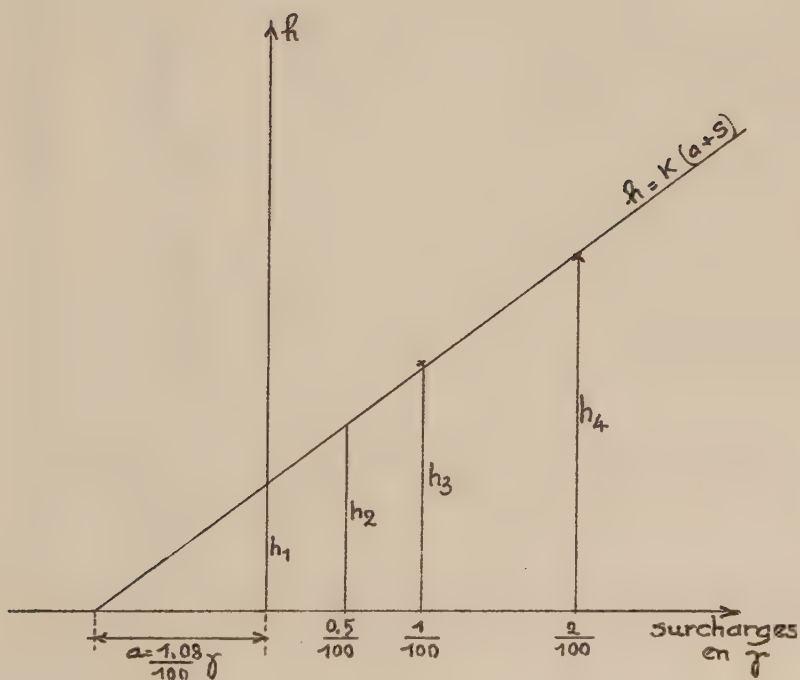


Fig. 8

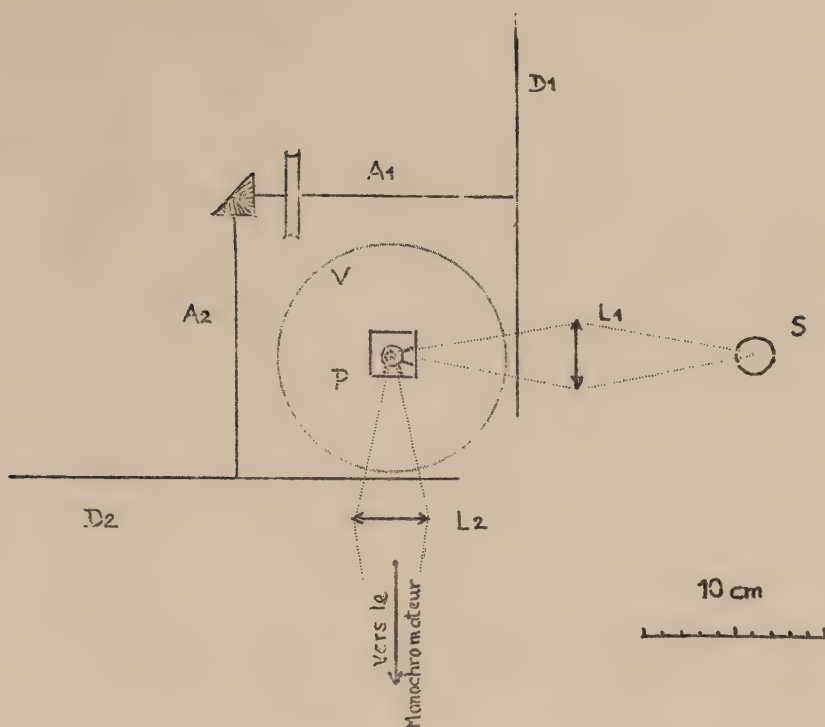


fig. 9 - Phosphoroscope.

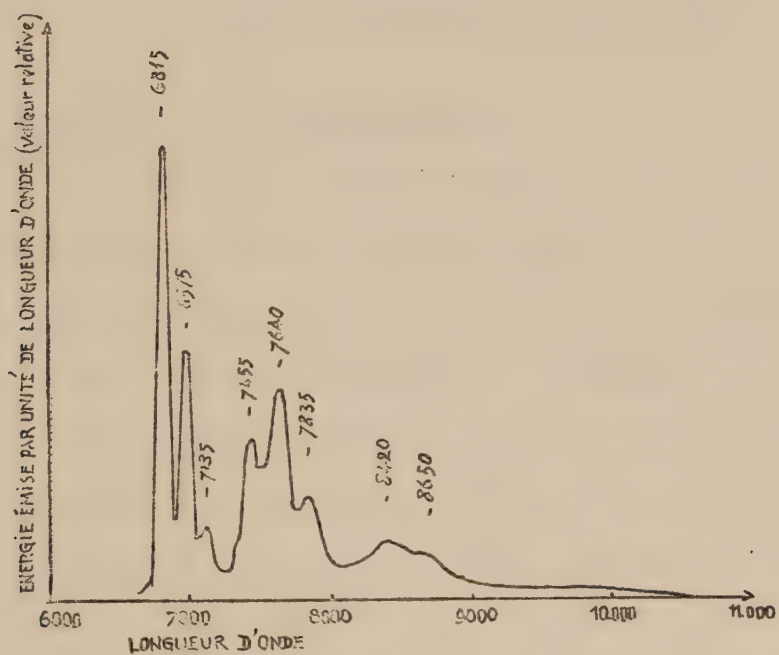


fig. 10 - Spectre de phosphorescence du benzo-3,4 pyrène.

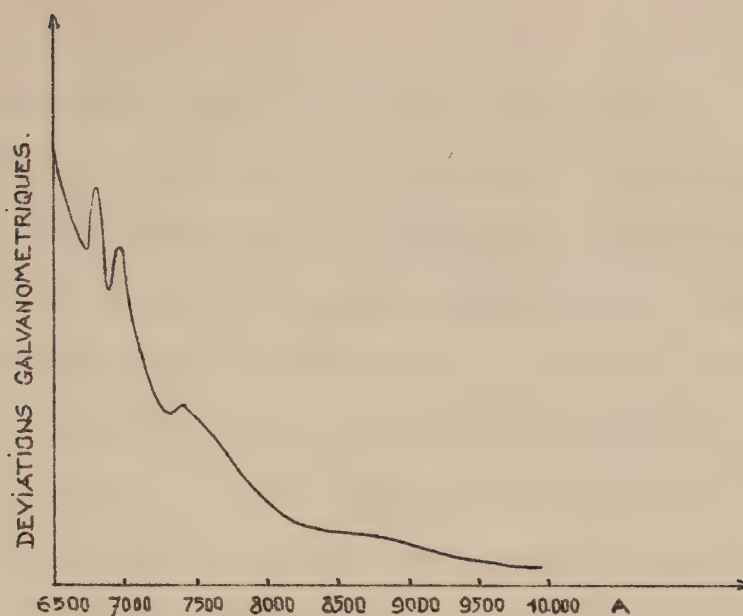


Fig.11 - Phosphorescence à - 180° C d'un extrait de
fumée de papier à cigarettes

2°) En absorption ultraviolette.

Les spectres d'absorption ont été enregistrés avec un spectrophotomètre Beckmann, modèle D.U., sur les solutions qui présentaient un spectre de fluorescence satisfaisant. D'une manière générale, la fluorescence a été utilisée pour la détection, l'absorption U.V pour le dosage. Tous les résultats des dosages effectués par fluorescence ont été vérifiés en absorption, dans la mesure du possible.

Principe du dosage du benzo-3,4 pyrène par son spectre d'absorption.

Les spectres de fluorescence, par leur richesse en bandes aigues, sont favorables à la détection du benzo-3,4

pyrène. Toutefois, ils conviennent mal pour une détermination quantitative par lecture directe, car l'intensité des bandes est trop sensible à la présence d'impuretés, en particulier à des traces d'autres hydrocarbures. En revanche, une fois prouvée par fluorescence la qualité d'une solution, son spectre d'absorption U.V permet d'effectuer des dosages précis de benzo-3,4 pyrène par comparaison avec une solution témoin de ce produit purifié. Nous avons, pour ce composé, vérifié la proportionnalité de la densité optique à la concentration dans le domaine des concentrations en cause dans ce travail, à savoir entre 0,5 et 10 γ /cm³ d'un mélange de 90 p. 100 de cyclohexane et de 10 p.100 de benzène. Considérons une solution étalon de 5 γ /cm³ (fig.I2). Parmi des accidents nombreux, sa courbe d'absorption présente notamment une bande culminant à 3 845 Å, encadrée par 2 minimums situés à 3 735 et 3 990 Å. Soient C, B, A ces trois points remarquables, et C', B', A', les points correspondants de même longueur d'onde de la courbe de l'échantillon à doser. L'abscisse passant par C et C' coupe en H et H' les droites AB et A'B'. La concentration q de benzo-3,4 pyrène, exprimée en microgrammes par centimètre cube de solution est :

$$q = 5 \frac{C'H'}{CH}$$

Etude d'un goudron de cigarettes du type
"gauloise"

1^o) Etude qualitative :

Nos premières analyses ont porté sur un goudron, obtenu par condensation de la fumée de cigarettes brûlées, dans une machine standard des laboratoires du SEITA, selon des modalités proches de celles de la consommation par l'homme (38). Nous avons utilisé 93 cm³ de goudron en solution acétonique pesant 78 grammes - soit 24 grammes de produit sec - provenant de 1040 cigarettes fumées par groupe de 24. Ce goudron fut soumis au traitement suivant :

Dilution dans l'acétone ;

Extraction au cyclohexane en présence d'eau ;

Lavages répétés de la solution cyclohexanique par l'acide chlorhydrique à 10 % ; on arrête ces extractions quand l'eau chlorhydrique de lavage reste incolore en présence de la solution organique ;

Essorage de l'insoluble et lavage de celui-ci à l'eau, puis au cyclohexane ;

Nouveaux lavages de la solution cyclohexanique par la soude à 10 % : un précipité se forme mais beaucoup moins abondant que lors du lavage acide. On épuise ce précipité à l'eau et au cyclohexane ;

On lave ensuite à l'eau l'ensemble de l'extrait cyclohexanique, le sèche sur sulfate de sodium et le concentre. On le soumet alors aux chromatographies.

Première chromatographie : sur une colonne d'alumine de 24 x 2 centimètres. Cette alumine a été préalablement desséchée pendant 18 heures à 180°. Elution sous vide au benzène. On recueille tous les échantillons fluorescents - sélectionnés en spectroscopie de fluorescence à basse température - on les mélange, les évapore à sec et les reprend au cyclohexane.

Deuxième chromatographie : sur une colonne identique à la précédente. Elution accélérée par légère réduction de pression avec des mélanges 5 cm³ de benzène + 95 cyclohexane, 10 benzène + 90 cyclohexane etc ...

Troisième chromatographie : semblable à la seconde, sur une colonne de 15 x 1 cm.

Quatrième chromatographie : semblable à la deuxième, sur une colonne de 14 x 0,6 cm.

Cinquième chromatographie : sur une colonne de silice de 7 x 0,6 centimètres. Elution avec 5 cm³ benzène + 95 cyclohexane, puis 10 benzène + 90 cyclohexane etc... On obtient ainsi un échantillon satisfaisant présentant des spectres caractéristiques du benzo-3,4 pyrène. Afin de préciser plus avant l'aspect qualitatif de l'hydrocarbure incriminé, et son éventuelle identité avec le benzo-3,4 pyrène, on procède alors à deux autres chromatographies :

Sixième chromatographie : semblable à la cinquième, sur une colonne de 15 x 0,6 cm. Elution avec des mélanges

identiques à ceux de la précédente chromatographie.

Septième chromatographie : semblable à la sixième.

L'analyse spectroscopique - tant en fluorescence qu'en absorption ultraviolette - des éluats de cette septième chromatographie permet l'identification du benzo-3,4 pyrène. La figure 13 montre l'évolution de la purification au cours de la série de ces chromatographies. La figure 14 donne la superposition des spectres du benzo-3,4 pyrène de référence et du benzo-3,4 pyrène des éluats, au terme de cette série de chromatographies.

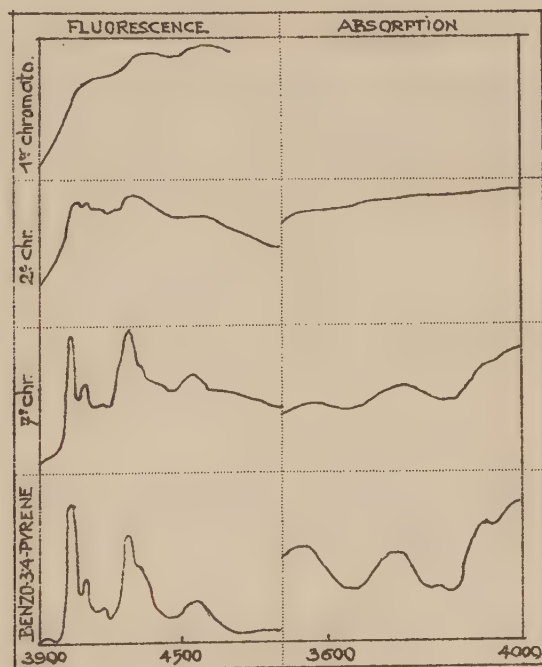


Fig.13 - Evolution des courbes de fluorescence à température ambiante et d'absorption UV des éluats, au cours des chromatographies d'un extrait de goudron formé par combustion de cigarettes "Gauloises".

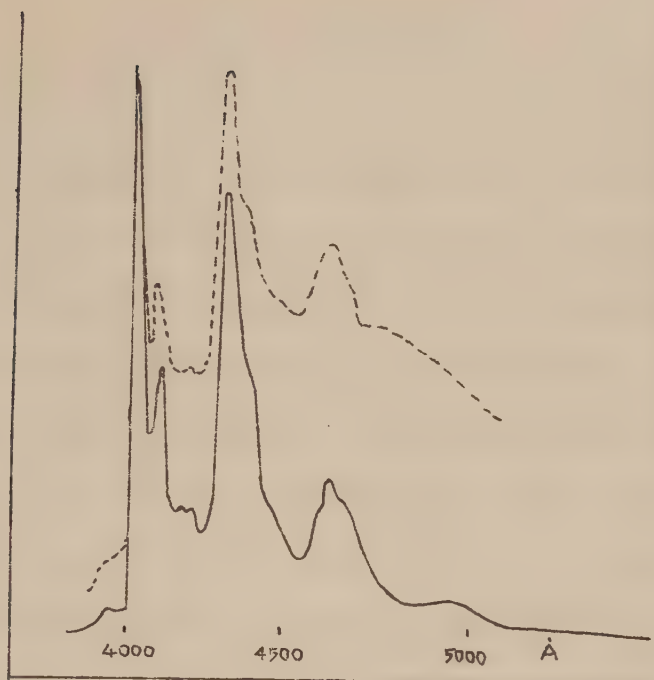


Fig.14 - Superposition des spectres de fluorescence à température ambiante du benzo-3,4 pyrène de référence et des éluats.

----- : Benzo-3,4 pyrène

———— : Extrait des produits de combustion de cigarettes.

Puis, nous inspirant des techniques de Tarbell et collaborateurs (39) d'une part, de Van Dureen (32) d'autre part, nous avons soumis la sélection des échantillons de notre dernière chromatographie sur colonne à une purification par chromatographie sur papier. Nous avons alors enregistré les spectres de fluorescence - tant à basse température qu'à température ambiante - ainsi que les spectres d'absorption des taches dont le Rf correspondait à la molécule du benzo-3,4 pyrène.

Une feuille de papier Whatman 1 est séchée pendant 45 minutes à 120° en étuve, puis saturée de diméthylformamide. On applique au bas de la feuille plusieurs taches d'une partie du mélange issu de la septième chromatographie sur colonne. Puis on procède à un transport par une solution d'hexane saturé de diméthylformamide, suivant les techniques de chromatographie ascendante sur papier. Après vingt quatre heures d'abandon, on sèche et révèle à la lampe à UV. On observe pour chaque ligne chromatographique de développement, trois taches, dont une centrale très importante. Les Rf de ces taches sont : 0,40 - 0,53 - 0,73. Le Rf de la tache centrale correspond à celui du benzo-3,4 pyrène pur, tel que l'indique Van Dureen. Par contre les Rf des deux autres taches ne correspondent à aucun de ceux qui caractérisent des hydrocarbures polycycliques connus. L'extraction de ces taches au benzène RP et leur étude spectroscopique ne nous ont pas permis de définir la nature des composés correspondants. La tache centrale, extraite de la même façon, nous a fourni une courbe de fluorescence identique à celle du benzo-3,4 pyrène de référence; il en est de même pour le spectre déterminé à basse température qui présente l'avantage de fournir une analyse de bandes beaucoup plus détaillée (fig. 15 ; Spectre de référence à basse température : Fig. 6).

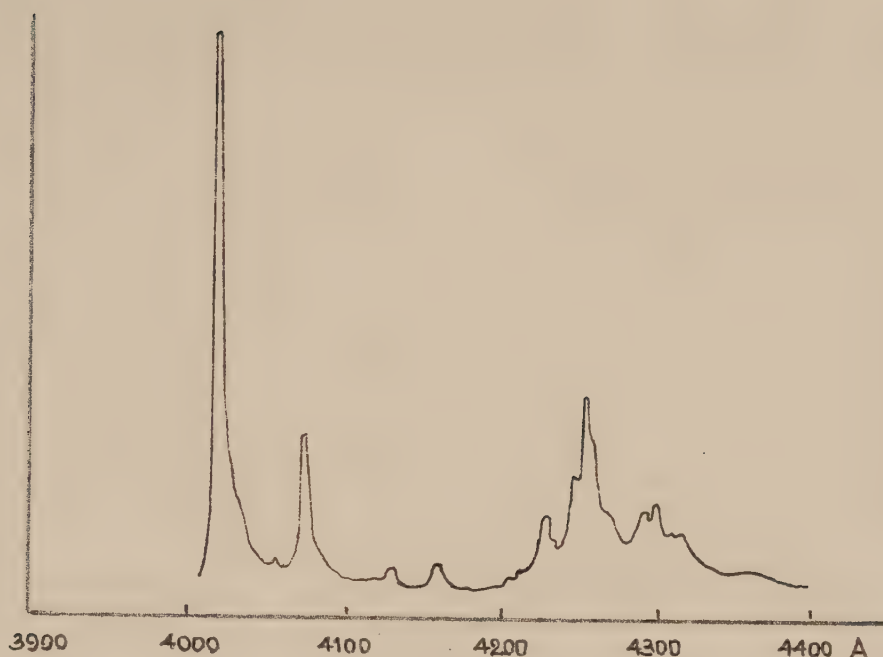


Fig. 15 - Spectre de fluorescence à -180° du benzo-3,4 pyrène extrait d'un goudron de cigarettes "gauloise" après sept chromatographies sur colonne et une chromatographie sur papier.

L'utilisation de la fluorescence à basse température permet ainsi de prouver la présence du benzo-3,4 pyrène dans les goudrons de cigarettes. En effet, ce spectre présente une richesse exceptionnelle en bandes qui rend difficile toute confusion avec le spectre d'un autre hydrocarbure, même très voisin. Par son extrême sensibilité, cette méthode permet d'effectuer une détection rapide de l'hydrocarbure dans un goudron non traité. C'est ainsi que la détermination du spectre de fluorescence à basse température d'une solution d'octane dans laquelle on a insufflé une seule bouffée de fumée de cigarette, laisse apparaître à la longueur d'onde

correspondant à celle où se situe le pic maximum du spectre, un léger épaulement caractéristique, comme le montre la figure 16.

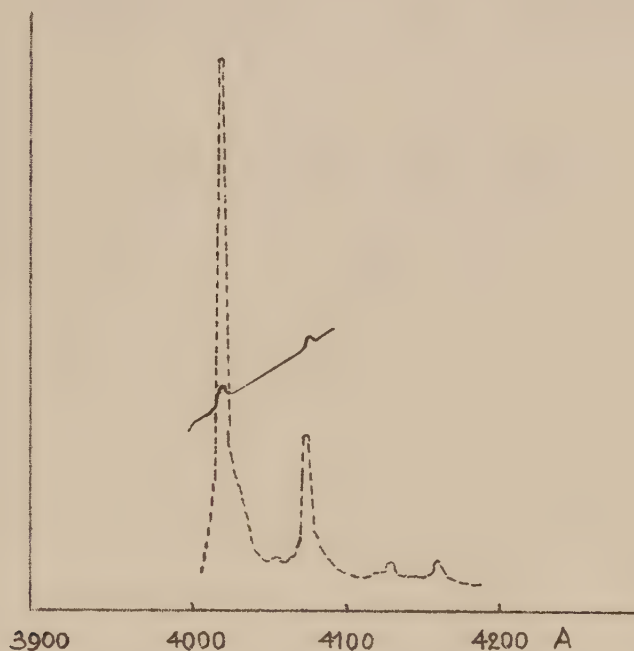


Fig. 16 - Spectre de fluorescence à basse température d'une bouffée de cigarette insufflée dans l'octane.

2°) Etude quantitative :

Sur le mélange des éluats sélectionnés d'après leur spectre de fluorescence, nous avons effectué un dosage en spectroscopie d'absorption, selon la méthode décrite précédemment. Nous avons évalué à 12 μ , la quantité de benzo-3,4 pyrène présent dans les goudrons de combustion de ces 1000 cigarettes. Cette expérience répétée plusieurs

fois sur un goudron de même origine, selon un processus opérationnel identique, nous a confirmé ce chiffre, à $\pm 10\%$ près. Au cours de nombreuses expériences effectuées parallèlement au Service des Laboratoires du SEITA, M. CUZIN a trouvé des quantités variant de 11 à 13 $\times$ pour 1000 cigarettes.

Ce résultat présente quelques écarts - au demeurant assez peu significatifs - par rapport aux quantités décelées dans les divers pays pour un même nombre de cigarettes. En effet, tandis qu'en Angleterre, Cooper et ses collaborateurs (11-26) estiment à 8 $\times$ la quantité de benzo-3,4 pyrène présent dans les goudrons de 1000 cigarettes, aux Etats-Unis Wright et Wynder (40) trouvent 8 également, mais Van Dureen (32), 5 et en Suisse Bonnet et Neukomm (31), 22. La valeur moyenne de nos mesures se situe donc dans l'ordre des estimations étrangères. Toutes les quantités indiquées précédemment restent en effet très comparables, les écarts pouvant se justifier a priori par l'utilisation de tabac d'origines variées et par les différences des procédés de combustion, de piégeage des fumées et de traitement. Nous reviendrons toutefois plus tard sur la signification exacte de ces dosages et sur les interprétations que l'on peut en tirer quant au phénomène de pyroformation des hydrocarbures polycycliques.

Etude d'un goudron de papier à cigarettes du type

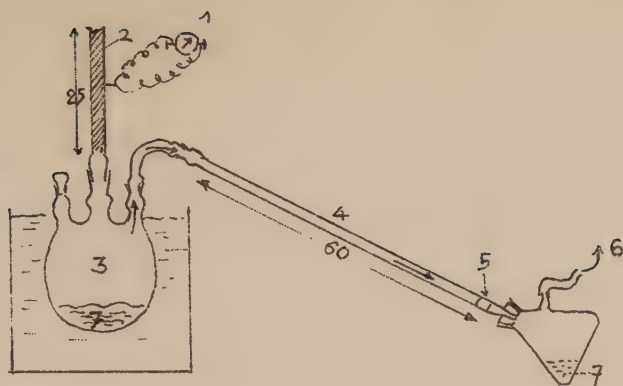
"Vélin Gauloise"

Après avoir détecté et dosé le benzo-3,4 pyrène dans les goudrons de combustion de la cigarette, nous avons appliqué nos méthodes aux produits de combustion du seul papier à cigarettes. En effet, certains auteurs tendaient alors à incriminer le papier comme unique responsable de la pyroformation du benzo-3,4 pyrène au cours de la combustion de la cigarette totale. Il était donc intéressant d'étudier séparément ce papier à cigarettes, qui offrait le double avantage d'être un élément constitutif de la cigarette et de présenter une composition chimique beaucoup moins complexe que celle de cette dernière. Dans ce domaine nous nous sommes inspirés des travaux d'Alvord et Cardon (41), qui, aux Etats-Unis, avaient abordé l'étude de ce problème.

Le système de combustion ainsi utilisé constitue un modèle expérimental. Les conditions de combustion adoptées sont évidemment très éloignées de celles qui président au "fumage" de la cigarette. Les conclusions qui pourront être tirées des expériences ainsi réalisées devront tenir compte de l'aspect schématique de ce système.

1°) Combustion du papier.

Notre appareil (fig.17) est dérivé de celui d'Alvord et Cardon.



- 1 THERMO-COUPLE
- 2 TUBE A COMBUSTION
- 3 BALLON 1 LITRE IMMERGÉ DANS L'EAU FROIDE
- 4 RÉFRIGÉRANT A AIR
- 5 LAINE DE VERRE
- 6 ASPIRATION DE LA TROMPE A EAU
- 7 CONDENSATS

Fig.17 - Appareil à combustion.

Sur un rouleau commercial, on prélève 30 grammes de papier sous forme d'un écheveau de 40 éléments de 150 centimètres de longueur. L'écheveau est coupé en 3 parties égales que l'on serre en torsades et que l'on entasse ainsi dans le tube. La vitesse de combustion est réglée par l'aspiration d'une trompe à eau et par le tassement de l'écheveau et du coton de verre obturateur. La température atteinte est mesurée au passage de la flamme par une soudure thermo-électrique nickel-constantan située à la partie médiane du tube.

Trois cents grammes de papier sont ainsi brûlés par fractions de 30 grammes. La combustion tend à se ralentir à mesure que l'opération se déroule, car les substances goudroneuses se fixent sur le coton de verre et le rendent de plus en plus compact.

A l'exception du tube à combustion, sur les parois duquel un résidu de cendre est collé, l'ensemble de l'appareil

reil est lavé avec un mélange de 400 cm³ d'acétone et 50 cm³ d'eau. Les substances insolubles entraînées sont éliminées par filtration. La solution-mère acétonique est alors reprise plusieurs fois par du cyclohexane RP dans une ampoule à décantation. Leurs extraits cyclohexaniques rassemblés sont eux-mêmes lavés à l'eau (afin d'entraîner les traces d'acétone), puis séchés sur chlorure de calcium.

2°) Analyse chromatographique du goudron de papier.

Elle comporte les opérations successives suivantes :

a) La solution cyclohexanique est versée sur une colonne d'alumine, de 2 x 40 cm, l'alumine ayant été préalablement maintenue pendant plusieurs heures à 180°. A l'extrémité de la colonne, on récupère le cyclohexane, et l'on vérifie au spectrophotomètre que les carbures ont bien été fixés.

On procède ensuite à une élution au benzène RP, accélérée par une faible dépression que l'on maintient à la base de la colonne au moyen d'une trompe à eau. On recueille des échantillons successifs de 25 cm³ dans lesquels la présence d'hydrocarbures proches du benzopyrène est contrôlée par spectographie de fluorescence. Tous ceux d'entre eux qui en contiennent sont mélangés. On évapore ce mélange sous vide, en maintenant un chauffage suffisamment doux pour ne pas altérer le résidu. Une fois le benzène totalement évaporé, on reprend le résidu par 20 à 30 cm³ de cyclohexane.

b) Cette nouvelle solution plus concentrée est alors sou-

mise à une seconde chromatographie sur une colonne d'alumine plus petite que la précédente, de 1,2 x 20 cm. On élue cette fois-ci - toujours sous vide - avec des mélanges successifs de 5 cm³ de benzène pour 95 cm.³ de cyclohexane, 10 de benzène pour 90 de cyclohexane etc... et on réunit à nouveau tous les échantillons dont la courbe de fluorescence présente déjà des analogies avec celle du benzo-3,4 pyrène.

c) On procède alors à une troisième chromatographie sur une colonne d'alumine de 0,5 x 10 cm³, en utilisant la technique d'élution précédente. A ce stade, les courbes de fluorescence et d'absorption des échantillons ne sont guère améliorées.

d) Le produit final de ces 3 chromatographies sur alumine contient le benzo-3,4 pyrène. Pour améliorer encore l'isolement de ce carbure, nous procédons à 2 chromatographies supplémentaires sur silice (colonne de 2 x 7 cm), en éluant à pression ordinaire avec des mélanges de 5 cm³ de benzène + 95 cm³ de cyclohexane, 10 + 90, 15 + 85, ... etc.

La solution finalement obtenue est alors soumise à l'analyse spectrale.

3°) Résultat du dosage

Pour une quantité de 300 grammes de papier "vélin gauloise" brûlé dans les conditions sus-indiquées, nous évaluons à 250 X la quantité de benzo-3,4 pyrène formé. Il est à no-

ter que la température maximum enregistrée au cours de cette combustion atteind 900°. En répétant plusieurs fois cette expérience nous avons retrouvé des quantités du même ordre pour le même poids de papier brûlé dans des conditions analogues. Nous avons alors étendu nos expériences à divers types de papier commerciaux (Tableau I).

Tableau I

Type de papier	Poids de papier brûlé	Quantité de benzo-3,4 pyrène mesurée	Température maximum enregistrée au cours de la combustion.
Vélin gauloise	300	250	898°
Papier américain	300	200	884°
Vergé égyptien	100	98	880°
Papier Maïs	300	70	410°
Papier Palladium	300	70	626°

S'il n'apparaît pas d'écart significatif entre les résultats des trois premières expériences mentionnées dans le tableau I, il est en revanche très intéressant de signaler l'abaissement notable du taux de pyroformation du benzo-3,4 pyrène pour les deux derniers types de papier.

On sait que le papier Maïs est caractérisé essentiellement par sa faible combustibilité due à une texture très serrée, tandis que le papier dit "au Palladium" tient son nom même d'une surcharge en chlorure de palladium, qui peut

jouer le rôle de catalyseur d'oxydation. Ces deux observations nous laissèrent entrevoir l'intérêt qui pourrait s'attacher aux additifs chimiques susceptibles d'intervenir dans les phénomènes d'oxydation, d'une part ou dans leur expression thermique d'autre part, comme agents propres à réduire les quantités d'hydrocarbures polycycliques pyroformés au cours de la combustion des cigarettes. Nos deux hypothèses d'intervention se trouvèrent renforcées par certains résultats alors parus dans la littérature :

1°) Alvord et Cardon (41) affirmaient l'abaissement notable du taux de pyroformation du benzo-3,4 pyrène au cours de la combustion du papier à cigarettes par simple imprégnation préalable de ce papier par le sulfamate d'ammonium, ignifugeant bien connu (42-43). Cela corroborait nos propres observations concernant le papier Maïs.

2°) Tandis que Cooper et ses collaborateurs (44) enregistraient la formation de benzo-3,4 pyrène à partir de cigarettes dont le tabac était remplacé par de petits morceaux de papier à cigarettes, Wynder et ses collaborateurs (40) ne décelaient aucune trace de cet hydrocarbure en faisant brûler ce même papier en couche mince sur des rouleaux métalliques. Nos propres expériences montraient une formation de benzo-3,4 pyrène en quantité relativement supérieure à celle trouvée par Cooper et ses collaborateurs pour un poids égal de papier, mais très inférieure cependant à celle indiquée par Moureu et

ses collaborateurs (45), qui procédaient à une pyrogénéation en vase clos. La quantité de benzo-3,4 pyrène formé apparaissait ainsi liée directement au degré d'aération de ces diverses combustions. Wynder et ses collaborateurs, qui effectuaient des combustions en couches minces - donc en atmosphère très oxygénée - n'obtenaient pas de benzo-3,4 pyrène, tandis que Cooper et ses collaborateurs en décelaient un peu à la suite d'une combustion en atmosphère moins oxygénée. Dans notre cas, le papier tassé dans une cheminée de combustion subit une pyrolyse en sous-oxygénation relative, et mène à la formation d'une quantité appréciable de l'hydrocarbure. Cette quantité diminue en présence de catalyseur d'oxydation. Enfin, en incinérant le papier à l'abri de l'air, Moureu enregistre le plus grand taux de formation du benzo-3,4 pyrène.

Etude d'un "Modèle cigarettes"

Avant d'étendre par de nouvelles expériences l'application de ces observations, nous avons réalisé un essai de combustion de cigarettes totales empilées dans la cheminée de l'appareil précédemment décrit. Nous visions la mise au point d'un "Modèle cigarettes" comparable au "Modèle papier".

1^o) Combustion :

Nous avons brûlé 50 paquets de cigarettes "disques bleus", par groupes de 40 cigarettes empilées dans la colonne à combustion de l'appareillage indiqué à la figure 17. Les

températures enregistrées régulièrement au cours de cette opération se situaient entre des limites de 700 à 850°.

Le coton de verre doit être changé environ toutes les deux étapes de combustion (représentant 60 cigarettes) de façon à maintenir l'aspiration de la trompe à eau. Chaque bourre de coton de verre prélevée est conservée pour extraction.

On doit opérer sous une hotte à fort tirage, pour assurer une protection contre les émanations nocives produites par la combustion.

2°) Traitement :

Il fut identique à celui de l'expérience sur cigarettes brûlées dans une machine à fumer : Extraction et lavage de l'appareillage à l'acétone; passage en milieu cyclohexanique; lavage basique jusqu'à disparition de la coloration des eaux de lavage; lavage à l'eau; lavage acide jusqu'à disparition de la coloration des eaux de lavage ; nouveau lavage à l'eau ; deshydratation sur chlorure de calcium ; distillation partielle du cyclohexane ...

3°) Chromatographies

1/ Sur alumine 140 x 50 mm ; élution au benzène.

On récupère tous les échantillons fluorescents en vue d'une autre chromatographie.

2/ Sur alumine 120 x 40 mm ; éluations par les mélanges suivants :

190 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène

180 cm³ de cyclohexane + 20 cm³ de benzène

etc ...

A ce stade nous récupérons encore tous les échantillons fluorescents, leurs spectres n'étant pas assez caractéristiques pour permettre d'établir entre eux une sélection efficace.

3/ Sur alumine 120 x 40 ; éluions par des mélanges identiques à ceux de la précédente chromatographie.

4/ Sur alumine 150 x 20 ; éluions par les mélanges suivants :

95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène

90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène

etc ...

Nous sélectionnons alors, d'après les courbes de fluorescence, les échantillons qui présentent les caractéristiques les plus proches de celles du benzo-3,4 pyrène. On opère toutefois un très large fractionnement, car l'appréciation qualitative de ces courbes ne peut encore être que très vague.

5/ Sur alumine 110 x 20 ; élution par des mélanges identiques à ceux de la précédente chromatographie.

Certains échantillons d'élution de cette chromatographie montrent une nette accentuation dans la région du premier sommet de la courbe de fluorescence du benzo-3,4 pyrène. A partir de cette observation, nous tentons un dosage prématuré et nous apprécions à environ 110 X la quantité possible de benzo-3,4 pyrène formé. Cette indication ne peut tenir

lieu de résultat définitif, étant donné la qualité insuffisante des courbes de fluorescence à ce stade.

6/ Sur alumine 130 x 20 mm ; élution sous pression d'air avec des mélanges identiques à ceux de la précédente chromatographie.

Les courbes de fluorescence s'améliorent nettement, mais nous continuons les éluions en vue d'un dosage à partir des courbes d'absorption UV. Le dosage effectué sur les spectres de fluorescence donne 88 % de benzo-3,4 pyrène.

7/ Sur silice 150 x 20 mm ; élution sous pression d'air par des mélanges identiques à ceux de la précédente chromatographie.

Le dosage en fluorescence sur la première bande indique 71 %

sur les trois premières

bandes 109 %

En absorption, on trouve 130 %

On évalue alors le chiffre singnificatif entre 71 et 109 %. Contrairement à ce qui a été dit précédemment dans ce cas particulier, on ne peut tenir compte de la mesure effectuée sur le spectre d'absorption. En effet, d'après la courbe de fluorescence, on constate que le ou les corps étrangers qui perturbent cette courbe se manifestent surtout par l'accentuation de la deuxième bande du spectre du benzo-3,4 pyrène, ce qui pourrait expliquer l'exagération trouvée dans le calcul quantitatif à partir de la courbe d'absorption, où

les bandes sont plus larges.

8/ Sur alumine 80 x 20 mm ; élution sous vide^{par} des mélanges identiques à ceux de la précédente.

Le dosage en fluorescence donne sur la première bande	68 %
sur les trois premières bandes	84 %
en absorption	80 %

A ce stade, les résultats sont suffisamment significatifs eu égard à la qualité des courbes enregistrées pour permettre d'évaluer la quantité de benzo-3,4 pyrène formé à 80 %, soit 8 fois plus que dans la combustion effectuée dans la machine à fumer.

Toutefois, nous décrirons plus loin des expériences de surcharge qui conduisent à considérer que ce chiffre est sous-évalué, des pertes ou des destructions partielles de l'hydrocarbure ayant pu survenir au cours des nombreuses opérations de fractionnement de ce mélange d'une exceptionnelle complexité obtenu par "combustion anoxique" des cigarettes. Cependant, on peut tirer dès maintenant de la présente expérience des conclusions qui ne pourront être entachées par le fait que le chiffre énoncé ici représente sans doute une valeur minimum.

Conclusions : Cette augmentation notable de la quantité de benzo-3,4 pyrène formé à partir de cigarettes brûlées en colonne par rapport à celle que fournit un même nombre de cigarettes brûlées sur machine-robot peut être attribuée aux facteurs suivants :

1) Dans la combustion en colonne, la cigarette est brûlée entièrement, contrairement à celle de la machine à fumer, où les mégots sont éliminés (ces derniers retenant une part de benzo-3,4 pyrène (46) et pouvant donner eux-mêmes naissance à une quantité supplémentaire de l'hydrocarbure).

2) La combustion en tube constitue un type de pyrolyse en atmosphère moins oxygénée que la combustion en "machine à fumer", et doit ainsi, en fonction de nos connaissances sur la pyroformation des hydrocarbures polycycliques, entraîner une augmentation du taux de ces derniers.

Etant donné que le poids de papier dans une cigarette de 1 gramme est d'environ 0,035 gr, on peut évaluer à 35 gr le poids total du papier présent dans les 1000 cigarettes que nous avons brûlées. Or nous avons vu que dans des conditions analogues de combustion, 300 g de papier fournissent 250 γ de benzo-3,4 pyrène. Il apparaît donc que la fraction de benzo-3,4 pyrène issu de la seule combustion du papier dans la présente expérience doit être environ de 30 γ .

La différence de 50 γ , donnée par le dosage effectué sur le goudron total, peut donc être attribuée au tabac lui-même, à condition qu'une comparaison puisse être établie entre la combustion du papier seul ou inclus dans un mélange aussi complexe que celui qui est constitué par la cigarette totale.

Origine des hydrocarbures décelés dans la fumée
de la cigarette.

Au terme de cette première partie de notre travail, où nous avons pu mettre en évidence la présence de benzo-3,4 pyrène dans les condensats de fumée de cigarettes et de papier à cigarettes, et avant même de vouloir définir d'une façon plus précise la valeur quantitative de nos dosages, il nous apparaît nécessaire d'étudier les mécanismes qui peuvent rendre compte de l'apparition de cet hydrocarbure.

La formation de benzo-3,4 pyrène, et plus généralement celle des composés polycycliques condensés, au cours de combustions comme celles que nous avons décrites, relève d'un processus de pyroformation très général. On sait, en effet, que le chauffage de nombreuses substances organiques de structures très diverses entraîne la formation de composés carbo-polycycliques. Flory (47) indique qu'en portant à des températures de 450 à 700° des substances aussi différentes que le charbon, l'isoprène, les pétroles, le cholestérol, l'essence de térébentine, le riz poli, le sucre brut et même la peau humaine, on produit des substances cancérigènes. Cook et ses collaborateurs (29) ont caractérisé le même type de molécule dans la suie provenant du chauffage ménager. Kotin (48) a pu doser ces hydrocarbures dans les gaz des tuyaux d'échappement des voitures etc ... D'une façon plus générale, il apparaît que toute substance organique brûlée dans certaines conditions

de température et d'aération se transforme partiellement en hydrocarbures polycycliques condensés.

La combustion des substances cellulosiques constitue ainsi un exemple particulier d'un phénomène courant, et toute hypothèse d'explication du mécanisme de la pyropolycondensation doit être ramené à une ligne générale commune à tous les cas.

Il est vraisemblable qu'à partir des substances complexes que nous venons de citer, le processus de condensation doit être précédé d'une phase de dégradation en petites molécules hydrocarbonées. Ainsi, la cellulose brûlée dans des conditions d'anoxie suffisante pour éviter l'oxydation totale en gaz carbonique et en eau, subirait, dans une première étape, une première décomposition partielle, par effet de craquage, en résidus du type acétylénique. Puis dans une deuxième étape, fixée entre certaines limites de température, ces résidus pourraient subir soit une copolymérisation, soit une autocondensation en grosses molécules hydrocarbonées cycliques.

A l'appui de cette hypothèse, il est intéressant de rappeler, d'une part les travaux de Fishel et Hakins (19) qui caractérisent dans la fumée de tabac la présence d'acétylène, et d'autre part les travaux de Bonnet et Neukomm (31) qui découvrirent du phénylacétylène dans l'une des sous-fractions du goudron neutre de la cigarette. Divers auteurs ont signalé

l'existence d'autres molécules insaturées du même type - comme le méthylacétylène, le butadiène, l'isoprène etc (15) qui doivent provenir d'une pyrodestruction anoxique primitive de la cellulose.

Quant au phénomène de recondensation, il est étayé par les expériences classiques de Berthelot (50) qui, dès 1886, avait obtenu en chauffant de l'acétylène, un mélange goudronneux riche en benzène et en hydrocarbures polycycliques. On doit citer également, en ce sens, les travaux de Kennaway (51) qui obtint des substances cancérigènes par chauffage d'acétylène et d'autres molécules non saturées à des températures de l'ordre de 700°; ceux de Lam (52), qui réussit la pyropolycondensation - notamment en benzo-3,4 pyrène - d'hydrocarbures aliphatiques isolés de la fumée de cigarettes; ceux enfin de Wright et Wynder (40) qui obtinrent de la même façon du benzo-3,4 pyrène, du chrysène, du pyrène, de l'anthracène et du fluoranthène .

La pyroformation des molécules condensées procédant de ce double phénomène de pyrodestruction suivie de polycondensation, est liée à certaines conditions :

1°) la substance brûlée doit être hydrocarbonée.

2°) la température de combustion doit dépasser une limite critique d'environ 400-450° (53-54) au-dessous de laquelle il ne se produit pas de substance cancérigène.

3°) La formation d'hydrocarbure implique une sous-oxygénation relative du milieu en combustion.

Nos propres expériences étayent ces observations. Les écarts que nous avons notés entre les quantités de benzo-3,4 pyrène formé au cours de nos différentes combustions de papiers divers, peuvent être expliqués en fonction des facteurs précédemment cités.

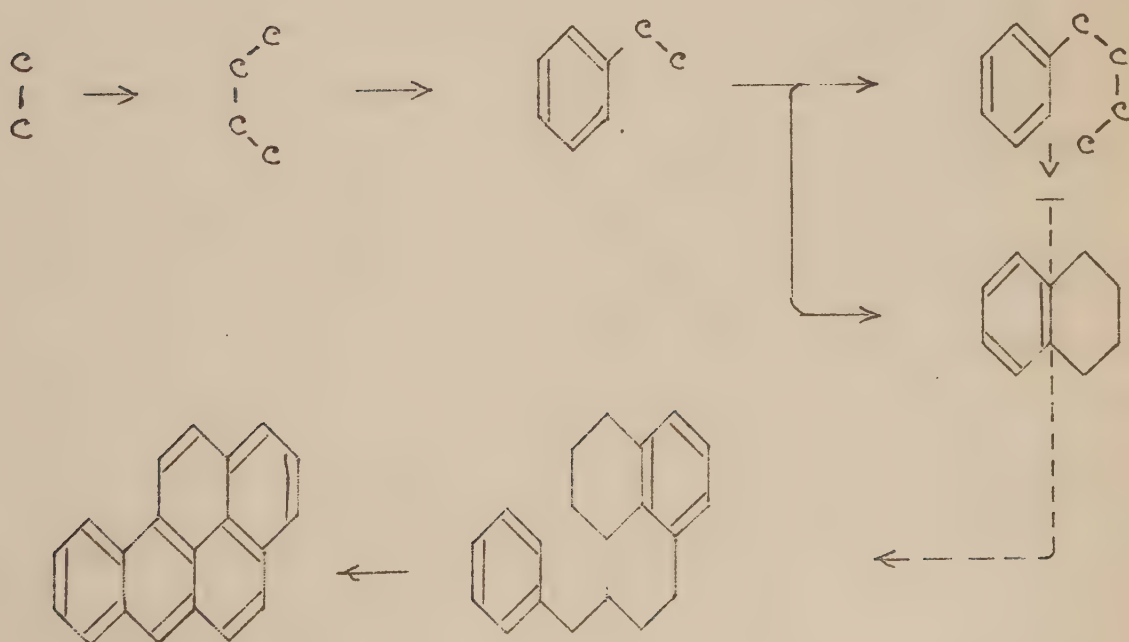
Tandis que 300 grammes de "vélin gauloise" produisant 250 % de benzo-3,4 pyrène, la même quantité de papier Mais qui brûle à une température inférieure (410° au lieu de 890°) n'en donne que 79 %. Quant à l'abaissement du taux de benzo-3,4 pyrène formé à partir du papier Palladium, il proviendrait de l'abaissement de la température de combustion (626° au lieu de 890°) d'une part, de la présence de chlorure de palladium jouant le rôle de catalyseur d'oxydation, d'autre part.

On peut expliquer de la même façon, tous les écarts en benzo-3,4 pyrène enregistrés par plusieurs auteurs à partir de papiers brûlés dans des conditions d'aération différentes.

Certains auteurs (55) ont poussé plus loin l'interprétation du mécanisme de la pyroformation du benzo-3,4 pyrène dans la combustion de la cigarette, en établissant des schémas réactionnels précis, et en essayant de reproduire expérimentalement ces réactions aux différents stades de leur évolution. En essayant de constituer in vitro un modèle de la

pyroformation du benzo-3,4 pyrène à partir de molécules de complexité croissante, ces auteurs ont simultanément opéré la pyroformation de nombreux autres hydrocarbures polycycliques.

Ainsi Badger et ses collaborateurs ont étudié la pyropolycondensation de produits définis comme le styrène ou le phényl-1 Δ - aphtyl-4 butane. Ces auteurs ramènent ainsi à quelques réactions thermiques simples (craquage, synthèse diénique, cyclodeshydrogénation...) l'enchaînement qui pourrait conduire depuis les résidus hydrocarbonés aliphatiques à chaîne courte jusqu'aux dérivés polycycliques hautement dicarboné, une évolution du type suivant :



Il va de soi qu'une telle interprétation de la pyro-polycondensation couvre la formation d'une série de squelettes hydrocarbonés, dont le degré de condensation pourrait dépendre de la température. Par ailleurs d'autres enchaînements réactionnels pourraient aussi bien rendre compte de la pyroformation du benzo-3,4 pyrène, notamment à partir de molécules plus complexes que les résidus acétyléniques. On sait, par exemple, que la cyclodeshydratation des o.méthyl diarylcétones (réactions d'Elbs) produit des carbures polycycliques.

Une autre hypothèse importante consiste à faire procéder la polycondensation d'un enchaînement de radicaux libres formés par craquage des matières organiques en combustion. En effet, des radicaux libres ont été mis en évidence dans la fumée de cigarettes.

Il est évident que cette pyropolycondensation, à partir d'un mélange aussi complexe que la cigarette, doit faire intervenir simultanément plusieurs séries de réactions de types variés. Au demeurant, les hydrocarbures polycycliques, et en particulier le benzo-3,4 pyrène, ne constituent qu'une infime partie de composés définis que produisent la combustion du papier et celle du tabac, comme nous l'avons rappelé dans notre introduction, et l'on ignore la nature des interférences qui peuvent s'établir entre les très nombreuses réactions de thermodécomposition et de pyrosynthèse à l'origine de tous ces composés.

Essai d'appréciation de la valeur des dosages du benzo-3,4
pyrène dans les goudrons de papier et de
cigarettes.

S'il ne peut subsister de doute quant à la présence de benzo-3,4 pyrène dans les condensats de fumées de cigarettes, de nombreuses incertitudes entachent encore la rigueur des dosages qui en ont été faits. En effet, la photosensibilité de la molécule de benzo-3,4 pyrène d'une part, la complexité et le nombre des séparations chimiques et des purifications chromatographiques d'autre part, peuvent occasionner une destruction ou une perte plus ou moins importante. Notre méthode nous permet actuellement d'affirmer la présence d'une quantité minimum de cet hydrocarbure. La reproductibilité satisfaisante de cette méthode nous assure de la valeur relative de nos dosages, ce qui nous a permis, par exemple, de définir les conditions favorables à la pyroformation de l'hydrocarbure. Mais nous ne savons pas quel est l'écart réel entre les réponses de nos dosages et les quantités absolues du benzo-3,4 pyrène réellement présent dans les fumées.

Ainsi, nos expériences nous permettent d'évaluer à 12% la quantité de benzo-3,4 pyrène formé par combustion de 1000 cigarettes. La suite de traitements que nous faisons subir à un même type de goudron nous conduira toujours à une quantité du même ordre. Mais il serait intéressant de définir maintenant la valeur absolue de ce dosage.

Cette étude critique - appliquée à nos propres résultats - vise également, au moins dans son principe, à préciser la signification des chiffres jusqu'alors publiés en ce domaine par des auteurs utilisant des méthodes de dosage différentes.

Dans une première expérience, nous avons mis en relief l'effet possible de photodestruction du benzo-3,4 pyrène au cours de la chromatographie sur alumine :

A) Une solution de 10 % de benzo-3,4 pyrène synthétique dans 10 cm³ de cyclohexane pur est fixée sur une colonne d'alumine. Après 20 heures d'abandon, on amorce l'élution en faisant passer sur la colonne quelques cm³ de benzène, afin d'opérer un étalement de l'anneau de fixation du benzo-pyrène. Puis on abandonne de nouveau pendant une vingtaine d'heures. On élue finalement au benzène, et l'on dose le benzo-3,4 pyrène entraîné.

On constate une perte de 30 % du benzo-3,4 pyrène, par dosage à partir de deux pics (2970 Å et 3455 Å). Cette perte indique l'existence probable de phénomènes de photodestruction. Par ailleurs, la possibilité d'une rétention sur la colonne d'alumine très active ne doit pas être négligée.

B) Nous procédons à une expérience identique à la précédente, mais en opérant, cette fois, dans l'obscurité totale.

Les pertes relevées dans ces conditions ne s'élèvent plus qu'à 10 % .

La comparaison de ces deux expériences indique un effet destructeur de la lumière sur le benzo-3,4 pyrène au cours des chromatographes.

Dans ces deux expériences témoins, l'étalement voulu de l'anneau, d'une part, l'abandon prolongé sur la colonne, d'autre part, constituent des conditions très défavorables à la conservation du benzo-3,4 pyrène. Si ces expériences démontrent la possibilité d'une perte en hydrocarbure inhérente à la purification chromatographique elle-même, il est incontestable qu'une telle perte doit rester assez faible dans les conditions habituelles où nous opérons. Quoique limitée, elle ne peut cependant être exclue, eu égard au nombre parfois élevé des chromatographies successives.

Expérience de surcharge

Principe : Nous divisons une solution acétonique d'un goudron en deux volumes égaux. Puis à l'une de ces fractions, nous ajoutons une quantité connue de benzo-3,4 pyrène pur. Enfin, nous soumettons l'extrait primitif et l'extrait surchargé à des traitements séparatifs identiques, selon le protocole habituel. En effectuant, après chaque chromatographie, les dosages sur les deux solutions, nous pouvons finalement obtenir les indications suivantes :

1°) Une nouvelle confirmation qualitative de la présence du benzo-3,4 pyrène dans l'extrait de goudron. En effet, la fraction surchargée doit laisser apparaître aux longueurs

d'onde caractéristiques du benzo-3,4 pyrène une accentuation plus marquée de ses épaulements ou pics, proportionnel à la quantité en surcharge.

2°) La détermination d'écarts entre les deux dosages en fin d'opération. Sous réserve que ces écarts soient significatifs ils peuvent revêtir plusieurs interprétations :

a) Ils correspondent à la quantité d'hydrocarbure en surcharge.

Dans ce cas, notre méthode pourrait être considérée comme valable, sinon comme rigoureuse.

b) Ils sont supérieurs à la surcharge. Cela indiquerait, contre toute probabilité, que nos réponses habituelles sont surestimées.

c) Ils sont inférieurs à la surcharge. La comparaison entre l'écart observé et la quantité de benzo-3,4 pyrène mis en surcharge nous permettrait alors d'apprécier le coefficient de perte qui entache notre méthode de dosage.

3°) L'évolution des réponses quantitatives au cours des chromatographies d'une part, celle des réponses des différents dosages pour une même chromatographie d'autre part, doivent permettre de comparer la signification exacte de plusieurs dosages effectués soit en fluorescence à basse température, soit en fluorescence à la température ambiante, soit, enfin, en absorption.

Nous avons réalisé des expériences de surcharge sur

3 types de goudrons, de complexité croissante :

1^o) Un goudron issu de la combustion du papier en anoxie relative, selon notre méthode usuelle.

2^o) Un goudron formé par condensation de la fumée de cigarettes brûlées individuellement en machine standard dans des conditions comparables à celles du fumeur humain.

3^o) Un goudron obtenu à partir de cigarettes entassées dans la cheminée de notre appareil à combustion (fig.17).

Les résultats ont été très différents selon les cas :

I - Surcharge d'un goudron d'origine "papier"

A) Combustion, traitement et dosage :

100 grammes de papier "vélin gauloise" sont brûlés dans l'appareil à combustion précédemment décrit (fig.17). Puis nous procédons à l'extraction par l'acétone des goudrons fixés dans les différentes parties de l'appareillage. La fraction insoluble est éliminée par filtration. Nous obtenons ainsi une solution acétonique de 568 cm³, que nous divisons en deux parties égales, désignées conventionnellement par A et B.

On ajoute 100 % de benzo-3,4 pyrène pur à la fraction B. On soumet les deux solutions au traitement suivant :

a) Passage en milieu cyclohexanique par dilution aqueuse de l'acétone et extraction au cyclohexane ;

b) Lavage à l'eau de l'extrait cyclohexanique ;

c) Dessiccation de l'extrait sur sulfate de sodium.

A ce stade, on opère un premier dosage du benzo-3,4 pyrène dans les deux fractions A et B, à partir des spectres de fluorescence à basse température. La présence du benzo-3,4 pyrène est déjà désignée par un pic assez accentué pour permettre une évaluation quantitative.

Résultats : Fraction A = 45 γ de benzo-3,4 pyrène

Fraction B = 140 γ "

Surcharge = 95 γ "

Ces chiffres indiquent une perte très légère de la surcharge, peu significative puisque ne sortant pas des limites de précision de la méthode de dosage.

On soumet alors les deux fractions A et B au traitement chromatographique suivant :

1ère chromatographie : sur alumine (60 x 40 mm) ; élution au benzène.

A ce niveau d'analyse, le dosage effectué, encore à partir des courbes de fluorescence à basse température, donne les indications suivantes :

Fraction A = 44 γ de benzo-3,4 pyrène

Fraction B = 160 γ "

Surcharge = 116 γ "

La surcharge semble donc surestimée. Cependant l'écart enregistré reste toujours du domaine de précision de la méthode de dosage.

2ème Chromatographie : sur alumine (50 x 20 mm); élution par

les mélanges suivants :

95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène

90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène

etc ...

La purification des échantillons paraît alors satisfaisante et permet l'emploi de la spectroscopie de fluorescence à température ambiante pour effectuer le dosage. On obtient les réponses suivantes :

Fraction A = 36 γ de benzo-3,4 pyrène

Fraction B = 109 γ "

Surcharge = 73 γ "

3ème Chromatographie : sur alumine (20 x 20); élution par des mélanges identiques à la précédente. Un premier dosage à température ordinaire nous fournit les indications suivantes :

Fraction A = 31 γ de benzo-3,4 pyrène

Fraction B = 120 γ "

Surcharge = 89 γ "

Remarque : Afin de limiter les erreurs expérimentales, nous avons effectué la série de chromatographies sur la fraction A et celle sur la fraction B dans des conditions aussi comparables que possible en ce qui concerne la dimension des colonnes, les volumes d'alumine, la conduite de l'élution etc...

B) Conclusion.

Les résultats enregistrés sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Niveau du dosage	Fraction A	Fraction B	Surcharge
Solution cyclo- hexanique	45	140	95
Eluats de la 1 ^{re} chromatographie	44	160	116
Eluats de la 2 ^{de} chromatographie	36	109	73
Eluats de la 3 ^{de} chromatographie	31	120	89

Du point de vue qualitatif, ces résultats confirment l'identité de l'hydrocarbure décelé et dosé dans les goudrons de papier avec le benzo-3,4 pyrène.

Du point de vue quantitatif, on enregistre globalement une perte d'environ 10 % de la surcharge, ce qui reste dans les limites de précision de la méthode pour la valeur qualitative des spectres enregistrés après 3 chromatographies. Les variations observées d'un dosage à l'autre correspondent à une progression dans la précision des mesures, au fur et à mesure de l'affinement des spectres, l'approximation de la mesure au niveau de la 1^{ère} chromatographie étant évidemment beaucoup plus large qu'à celui de la troisième. A ce moment, la valeur qualitative des spectres et, en conséquence, la signification des dosages, deviennent comparables à celles que nous avons toujours observées dans nos analyses précédentes des goudrons de papier. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas poussé plus avant la série des chromatographies.

Dans ces conditions, une appréciation rigoureuse de la quantité perdue de benzo-3,4 pyrène serait présomptueuse.

Les points essentiels, démontrés par la présente expérience sont les suivants :

1^o) La conservation d'un large excès d'hydrocarbure dans la fraction surchargée, à un stade assez poussé de l'analyse. Ce fait confirme la valeur relative des dosages effectués, quelle que soit l'incertitude de leur signification absolue. Il définit les limites entre lesquelles on pourra comparer les proportions de benzo-3,4 pyrène présent dans divers extraits de goudrons de papier. La détermination de ces limites était indispensable pour interpréter les expériences d'inhibition que nous décrirons plus loin.

2^o) Le fait que la perte enregistrée, du début à la fin de l'expérience, soit inférieure de la fraction A à la fraction B semble indiquer que cette perte augmente avec la quantité d'hydrocarbure existant en solution. La différence porte toutefois sur des chiffres (14 % pour A et 20 % pour B) trop voisins - eu égard à ce que nous venons de voir - pour suggérer autre chose qu'une indication.

3^o) Les résultats de l'analyse d'un goudron de papier donnent une idée assez convenable des quantités de benzo-3,4 pyrène réellement présentes dans ce goudron. En effet, les différences quantitatives entre les premiers et les derniers dosages pour chaque fraction d'une part, entre les dosages

des deux fractions d'autre part, restent assez négligeables dans les limites d'interprétation que nous avons définies.

II - Surcharge d'un goudron de cigarettes brûlées individuellement en machine standard.

(combustion en oxigénation normale)

Ces expériences ont été réalisées aux laboratoires du SEITA par M. CUZIN et ses collaborateurs, en liaison étroite avec nous-mêmes.

Le détail de ces expériences sera publié par ailleurs (E). Les dosages ont été effectués sur la fraction lipophile isolée au départ des condensats totaux préparés par coagulation mécanique directe de la fumée de cigarettes. Le tableau B (p.83) donne le schéma général du fractionnement de ces condensats. Les dosages sont effectués en absorption UV. Le tableau C donne des valeurs des dosages obtenus à partir de 500 cigarettes gauloise. Les résultats sont ramenés à 100 cigarettes. Les dosages de l'anthracène et du pyrène ont été opérés parallèlement à celui du benzo-3,4 pyrène. La concordance entre ces résultats et ceux que nous avons précédemment décrits (p.52) est excellente.

Poids du condensat brut (500 cig.) en grammes	Anthracène γ pour 100 cig.	Pyrène γ pour 100 cig.	Benzo-3,4 pyrène γ pour 100 cig.
9,26	12,3	15	1,1
11,30	13	15,6	1,2
10,67	11	14	1,3

Le dispositif expérimental ainsi défini constitue un instrument standard pour la réalisation d'analyses systématiques de goudrons chargés en hydrocarbures polycycliques condensés. La vérification de valeur de ce modèle a porté notamment sur les points suivants :

1^o) - Recherche de la proportionnalité entre les résultats des dosages effectués.

Cette opération a été conduite de façon à englober les risques d'erreurs correspondant à la totalité du parcours expérimental décrit. La variance totale des résultats proposés devra donc être considérée comme la somme des variances partielles attachées aux facteurs suivants :

- Importance des lots de cigarettes initiaux ;
- Allure de l'opération de fumage sur machine ;
- Evolution éventuelle du condensat stocké ;
- Nature des opérations analytiques décrites.

Dans ce but, on a soumis parallèlement aux opérations de fumage puis d'analyse , 3 lots de cigarettes provenant d'un stock commun.

Tableau B

Schéma général de fractionnement des condensats

(Technique SEITA)

Condensat de fumée (500 cigarettes ~~77~~ 10 g)

Mise en solution dans 500 ml de mélange hexane 1-méthanol 2

Démixion par addition d'eau

phase hydroalcoolique

phase hexanique

4 extractions par l'hexane

phase hydroalcoolique

phase hexanique

concentration

Chromatographie sur colonne silice-célite
(élution au n. hexane)

5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

Anthracène-Pyrène

Benzo-pyrène-Benzo pérylène

1ère chromatographie sur colonne
d'alumine

1ère chromatographie sur colonne
d'alumine

2ème chromatographie sur alumine
(élution au n. hexane)

2ème chromatographie sur alumine
(élution au n. hexane)

dosage anthracène ; pyrène

dosage benzopyrène ; benzo-pérylène

Les résultats de cette recherche sont présentés dans le tableau D.

Tableau D

ts de départ	nombre de cig.	poids en g du condensat	Hydrocarbures polycycliques condensés				
			dosés γ	A	Py	Bp	valeurs réduites à 100 cig.
300	6,6	34	31	3,1	11,3	10,3	1
600	11,42	-	57	5,0	-	9,5	0,8
900	18,68	95,4	82	8,1	10,6	9,1	0,9

: anthracène ; Py : pyrène ; Bp : benzo-pyrène

2°) Contrôle de fidélité par surcharge

On constitue deux masses de condensat obtenues au départ de deux lots de 250 cigarettes identiques , brûlées en conditions standards sur machine. Une des masses de condensat brut est additionnée dès le début de l'opération analytique d'une quantité connue, soit 2 γ de benzo-3,4 pyrène en solution hexanique.

Les résultats sont présentés dans le tableau E ci-dessous :

Tableau E

Lot	Nombre de cigarettes	Poids en grammes du condensat brut	Benzo-3,4 pyrène en γ dosé
Surchargé par 2 γ de benzo-3,4 pyrène	250	5,350	5,5
Témoin, sans surcharge	250	5,265	3,6

La surcharge ajoutée peut ainsi être considérée comme quantitativement retrouvée en fin de dosage.

Un essai analogue est repris, au départ de condensats de 3 lots (fumés de façon identique) de 200 cigarettes dont l'un ne reçoit aucune surcharge (témoin), les deux autres recevant une surcharge de 2 γ pour le premier et de 4 γ pour le second.

Les résultats sont présentés dans le tableau F ci-dessous :

Tableau F

Lot	Nombre de cigarettes	Poids en grammes du condensat brut	Benzo-3,4 pyrène dosé en γ
témoin	200	4,88	3,6
Traité par une surcharge de 2	200	4,14	5,8
Traité par une surcharge de 4	200	4,48	7,6

III - Surcharge d'un goudron de cigarettes brûlées en lot dans une colonne.

(Combustion en anoxie relative)

1ère expérience :

Dans notre appareil à combustion (fig.17) nous avons brûlé 1000 cigarettes "gauloise" dans les conditions de l'expérience dite "Modèle cigarettes". Un lavage de l'ensemble de l'appareil à combustion par l'acétone nous a fourni une solution de 1120 cm³.

Cette solution fut divisée en deux fractions égales de 560 cm³, la première fraction (A) fut utilisée directement, la deuxième fraction (B) fut surchargée de 52 γ de benzo-3,4 pyrène pur.

Après passage en milieu cyclohexanique, chaque solution fut soumise aux lavages acides et basiques, selon la séquence habituelle des opérations, puis chromatographiée comparativement sur des colonnes identiques. A l'issue des premières chromatographies jusqu'à la quatrième, nous devons utiliser la spectroscopie de fluorescence à basse température. Au fur et à mesure des traitements et de l'éclaircissement des éluats nous utilisons la fluorescence à température ordinaire et en dernier lieu l'absorption UV.

Les résultats enregistrés sont les suivants :

Niveau des dosages	Fraction A	Fraction B	Surcharge
1ère chromatographie	79	100	21
2ème "	73	136	63
3ème "	70	100	30
4ème "	62	82	20
5ème "	71	105	34
6ème "	41	67	26
7ème "	37	50	13
8ème "	25	46	21
9ème "	22	40	18
10ème "	24	35	11

2ème expérience :

Nous avons procédé comme pour la première expérience, mais la fraction B a reçu une surcharge de 150 γ de benzo-3,4 pyrène. L'évolution des dosages a été la suivante :

Niveau des dosages	Fraction A	Fraction B	Surcharge
1ère chromatographie	70	160	90
2ème "	65	122	57
3ème "	49	84	35
4ème "	40	55	15
5ème "	31	49	18
6ème "	33	43	10
7ème "	34	38	4
8ème "	30	34	4

A ce niveau d'analyse, nous avons effectué une seconde surcharge de la fraction B avec 50 γ de benzo-3,4 pyrène pur. Compte tenu des prélèvements d'échantillons opérés à la 8ème chromatographie, nous avons alors des quantités de benzo-3,4 pyrène correspondant à 26 γ pour la fraction A
à 80 γ pour la fraction B

Les chromatographies suivantes ont donné :

9ème chromatographie	21	80	59
10ème "	19	64	45
11ème "	13	34	21

Entre les 10ème et 11ème chromatographies nous avons abandonné le produit fixé sur la colonne d'alumine pendant 60 heures.

Les résultats de ces deux expériences montrent une perte importante du benzo-3,4 pyrène au fur et à mesure des chromatographies. Cette perte est plus rapide pour la fraction surchargée que pour l'autre fraction, ce qui semble indiquer que la vitesse de destruction du benzo-3,4 pyrène dépend des quantités de celui-ci mises en jeu. Cette observation renforce l'impression que nous avons eue lors de l'étude par surcharge d'un goudron de papier. Ici, la surcharge est réduite des quatre cinquièmes dans la première expérience, et quasi totalement dans la seconde. L'abandon prolongé sur colonne semble provoquer une destruction encore plus accentuée de l'hydrocarbure entre deux chromatographies successives.

En conclusion, il est impossible de déterminer avec quelques précisions la quantité de benzo-3,4 pyrène présent dans un goudron aussi complexe que celui produit par la combustion des cigarettes en anoxie relative. Les résultats quan-

titatifs obtenus sur un goudron de papier, ou de cigarettes brûlées en aération normale étaient suffisamment significatifs tant en valeur absolue que pour permettre la comparaison de plusieurs dosages. Ici, la seule indication valable est d'ordre qualitatif et concerne la présence du benzo-3,4 pyrène. C'est ce que montre l'exaltation des bandes caractéristiques après une seconde surcharge au cours de la série des chromatographies de la 2ème expérience.

Les chiffres trouvés au niveau des premières chromatographies sont déterminés à une très large approximation, du fait de l'imprécision qualitative des spectres à ce moment. Cependant, ils restent toujours très supérieurs à ceux trouvés pour des échantillons très purifiés, mais la différence est telle qu'elle ne peut être expliquée seulement, par l'imprécision des mesures. En conséquence, les quantités dosées de l'hydrocarbure au moment où il devient suffisamment bien isolé sont sans doute très sous-estimées.

Ces expériences rendent aléatoire l'utilisation de notre "modèle cigarette" pour toute recherche d'inhibiteurs de la pyroformation du benzo-3,4 pyrène.

DEUXIEME PARTIE

Recherche d'inhibiteurs chimiques de la pyroformation du benzo-3,4 pyrène

Comme nous l'avons montré par nos propres expériences et par l'interprétation des résultats de divers auteurs, la pyroformation du benzo-3,4 pyrène paraît liée à des conditions de température et d'oxygénation. La variation de ces facteurs influe sur le taux de pyroformation du benzo-3,4 pyrène. Nous avons essayé de préciser la façon d'opérer ces variations pour supprimer ou diminuer la formation de cet hydrocarbure cancérigène.

Nous avons réalisé cette étude sur du papier à cigarettes, brûlé dans l'appareillage précédemment décrit (fig. 17). Ce schéma opérationnel est facile à mettre en oeuvre et il respecte assez fidèlement les conditions essentielles qui président quotidiennement à la pyroformation d'hydrocarbures polycycliques dans l'industrie ou dans la vie pratique. L'utilisation de papier à cigarettes offre sur la cigarette totale des avantages suivants :

1°) Sa composition chimique est relativement simple. Par exemple, le "vélin gauloise", qui a servi de référence

contient principalement les produits suivants :

- 95 % d'alpha cellulose,
- 3,73 % de pentosanes,
- des traces inférieures à 0,01 de nitrates,
- et des traces inférieures à 0,025 de fer.

En outre, le papier à cigarettes supporte une charge de 20 % de CO_3Ca .

2^o) Ses goudrons de combustion sont beaucoup moins toxiques, donc plus aisément manipulables, du fait de l'absence de composants alcaloïdiques.

3^o) A poids égal et dans les conditions particulières de combustion que nous avons adoptées, il forme des quantités plus importantes de benzo-3,4 pyrène.

4^o) Il se prête assez facilement à des surcharges chimiques, par imprégnation dans des solutions aqueuses de substances chimiques appropriées.

5^o) Comme nous l'avons démontré, la composition des goudrons obtenus à partir du papier est relativement simple pour permettre l'appréciation quantitative qu'implique la détermination d'un effet inhibiteur.

Expériences préliminaires

Les premiers essais d'inhibition de la pyroformation du benzo-3,4 pyrène par imprégnation chimique du papier à cigarettes sont dus à des chercheurs américains de la "Rand Remington Corporation".

Avant d'étudier de nouveaux inhibiteurs, nous avons entrepris la vérification de ces résultats et nous avons appliqué le procédé indiqué à un papier à cigarettes français. L'interprétation du mécanisme de l'effet inhibiteur découvert par Alvord et Cardon (41) nous a fourni une première hypothèse de travail qui nous a conduits à l'emploi de nouveaux composés chimiques.

Effet des sels ammoniacaux sur la pyroformation du benzo-3,4 pyrène à partir du papier à cigarettes.

Alvord et Cardon ont étudié l'effet inhibiteur d'une série de composés minéraux et organiques sur un modèle papier comparable à celui que nous avons nous-mêmes utilisé. Ces auteurs ont essayé les substances suivantes :

Sulfate d'ammonium
Sulfate de potassium
Citrates de sodium
Triéthanol-amine
Sulfate d'ammonium
Persulfate de potassium
Acétate d'ammonium
Benzoate de sodium
Bisulfate de sodium
Chlorure de calcium
Peroxyde de benzoyle
Carbonate de sodium

Sulfate de sodium /

Acide benzoïque

Acide borique

Stannate de sodium

Pyridine

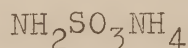
Acide gluconique

Sulfate double de sodium et de lauryle

Acide amygdalique

Chlorophylle

Il ne semble pas qu'une idée directrice simple (sinon ^{des} le fait que certains composés essayés soient/substances azotées comme il en existe dans le tabac) ait présidé au choix des composés testés. Le seul résultat positif de ces investigations fut la reconnaissance de l'action fortement inhibitrice d'un certain nombre de dérivés ammoniques et tout particulièrement du sulfamate d'ammonium :



Ce sel de l'acide amido sulfonique présente les propriétés caractéristiques suivantes :

a) il est très soluble dans l'eau ;

b) il se décompose par chauffage en donnant de l'imido sulfonate d'ammoniaque : $\text{NH}(\text{SO}_3\text{NH}_4)_2$ vers 200 - 260° et en fournissant de l'ammoniac vers 290 - 305° (56) ;

c) il est utilisé comme ignifugeant, comme nous l'avons déjà signalé (42-43).

Nous avons constaté que 300 grammes d'un papier américain, traité par une solution aqueuse à 5 % de ce sel, brûle à une température maximum de 668° et donne moins de 5 γ de benzo-3,4 pyrène (alors que la même quantité d'un papier de même origine en fournit environ 200 et brûle à 884°). Par ailleurs, nous avons noté des résultats analogues avec un papier français d'usage courant. L'effet inhibiteur ainsi réalisé est donc considérable puisqu'il abaisse à moins de 3 % la quantité pyroformée de benzo-3,4 pyrène.

Essai d'interprétation de l'action inhibitrice du sulfamate d'ammonium.

On peut difficilement évoquer une dénaturation du benzo-3,4 pyrène déjà formé, telle qu'il ne conserve plus ses propriétés analytiques initiales.

La liaison de l'action inhibitrice du sulfamate d'ammonium à ses propriétés ignifugeantes semble, par contre, plus logique. Nous avons, en effet, observé l'importance du facteur "température de combustion" sur le taux de formation des hydrocarbures polycycliques (Cf. Nos expériences sur les papiers français dits "maïs" et "au palladium"). Cependant, l'importance de l'effet inhibiteur enregistré, d'une part, la diminution relativement faible de la température de combustion provoquée par l'imprégnation, d'autre part, ne semblent pas permettre d'attribuer au seul pouvoir ignifugeant

du sulfamate d'ammonium son action inhibitrice. Nous avons donc envisagé une intervention chimique de ce sel dans le processus même de la pyropolycondensation. Un fait important à rappeler est en effet la grande instabilité du sulfamate d'ammonium pour une température bien inférieure à celle qui est atteinte dans la combustion du papier à cigarettes.

On peut encore concevoir que les composés ammoniacaux orienteraient la pyro-polycondensation vers des substances polyhétérocycliques azotées qui ne suivraient pas les hydrocarbures polycarbocycliques au cours des traitements chromatographiques. On sait que la décomposition du sulfamate à haute température fournit surtout de l'ammoniac mais aussi de l'azote et des anhydrides sulfureux et sulfurique. Or Dewar (57) a montré qu'en chauffant en rouge un mélange d'acétylène et d'ammoniac, on obtient du pyrrole. Meyer Wasche (58) a transformé le même mélange à 650°, en pyrrole, quino-
léine et naphthalène. On connaît les propriétés cancérigènes d'un certain nombre de dérivés azapolycycliques, comme les acridines ou les naphtyridines : il resterait à démontrer que l'effet inhibiteur incontestable du sulfamate d'ammonium correspond bien à une diminution du pouvoir oncogène des gou-
drons, sans quoi la recherche d'une diminution de concentra-
tion des hydrocarbures polycycliques serait illusoire.

Il existe enfin une autre hypothèse, certes difficile-

ment interprétable dans l'état actuel de nos connaissances. Nous avons déjà suggéré que la suroxygénation empêche la pyroformation du benzo-3,4 pyrène, puisque c'est seulement par combustion en anoxie relative que le papier en forme des quantités notables. Dans cette action, l'oxygène agirait par un mécanisme physicochimique indéterminé qui pourrait être assuré également par l'azote dont le comportement est à maints égards similaire à celui de l'oxygène dans le domaine réactionnel en cause. Les sels d'ammonium agiraient alors comme donneurs d'azote, réalisant une hypernitrogénéation aussi défavorable que l'hyperoxygénation à la formation du benzo-3,4 pyrène. A l'appui de cette hypothèse s'inscrit le fait que les deux produits ammoniques les plus actifs, sulfamate d'ammonium et sulfate d'urée, sont des composés oxygénés qui, lors de leur décomposition par la chaleur peuvent libérer de l'azote et non pas uniquement de l'ammoniac, alors que les sels non oxygénés qui dégagent exclusivement de l'ammoniac, sont en général moins actifs. S'il en était ainsi, l'effet inhibiteur des produits ammoniacaux agissant comme donneurs d'azote pourraient être assuré par des substances agissant comme donneurs d'oxygène.

On peut également envisager que le chauffage de sulfate d'ammonium (et des substances apparentées) entraîne la formation d'oxydes inférieurs de l'azote, par exemple N_2O

ou NO. Or, il est classique que ces oxydes peuvent jouer un rôle inhibiteur dans les réactions en chaîne du type Rice-Herzfeld, lesquelles interviennent dans la pyrolyse des hydrocarbures, et probablement, ici, dans celle des chaînes polyosiques.

Effet inhibiteur de composés oxygénés

A) Principes, méthodes et résultats

Nous avons signalé l'influence de l'oxygène atmosphérique sur la quantité de benzo-3,4 pyrène formé par combustion du papier à cigarettes. Cela nous a conduits à essayer comme inhibiteurs un certain nombre de composés pouvant fournir de l'oxygène à la température de combustion du papier.

En ce sens, nous avons retenu des sels très oxygénés comme le permanganate de potassium, le bichromate de sodium et le perchlorate de sodium dont la décomposition thermique produit de l'oxygène. Nous avons également étudié le nitrite de sodium qui libère par chauffage des oxydes d'azote très oxydants. Ces composés étant suffisamment solubles dans l'eau, nous avons pu réaliser une imprégnation satisfaisante par immersion du papier dans leur solution aqueuse pendant 17 heures. La simple plongée du papier dans la solution saline n'ayant pas permis d'obtenir un effet inhibiteur, on peut penser que la prolongation du temps de contact provoque

soit une pénétration suffisante de la charge minérale dans la cellulose, soit une transformation physicochimique adéquate de celle-ci. Ainsi, avec des sels très oxygénés mais relativement peu solubles dans l'eau comme le vanadate de sodium et le perchlorate de potassium la quantité de sel absorbé par le papier est insuffisante pour entraîner une inhibition valable.

Outre ces sels minéraux, nous avons étudié le mono-peroxyde dissuccinoylique qui possède le double avantage d'être soluble dans l'eau et non explosif, tout en présentant de remarquables propriétés oxydantes. L'effet inhibiteur relativement limité de ce peroxyacide organique peut s'expliquer par sa partielle décomposition en solution aqueuse au cours de l'imprégnation. Quant à l'eau oxygénée elle-même, l'emploi en a été rendu difficile par suite d'une dégradation partielle du papier en oxycelluloses solubles dans l'eau. Néanmoins, la combustion de papier traité par ce réactif donne des goudrons appauvris de 60 % en benzo-3,4 py-rène.

Nos expériences ont été effectuées sur 100 g de papier "vergé égyptien". Après imprégnation, essorage et dessication du papier vers 70°, nous avons suivi la séquence habituelle d'opérations : combustion dans l'appareil que nous avons déjà décrit (fig.15), extraction des goudrons à l'acétone, passage dans le cyclohexane, chromatographies

sur alumine avec élution par des mélanges benzène et cyclohexane, et enfin détection et dosage spectroscopiques.

Ces dernières mesures furent effectuées principalement en fluorescence, les résultats étant vérifiés, si possible, en absorption UV.

Les résultats de ces expériences, que nous allons décrire en détail, sont résumés dans le tableau suivant :

Concentration de la solution d'imprégnation		Quantité en M g de benzo-3,4 pyrène pour 100 g de papier
Pas d'imprégnation		100
$Cr_2O_7Na_2$ (1 %)		56 (++)
MnO_4K (0,1%)		18 (+)
(1 %)		14 (+)
NO_2Na (0,5 %)		88 (++)
(2,5 %)		20 (+)
(5 %)		8 (+)
(10 %)		4 (+)
ClO_4Na (5 %)		27 (+)
ClO_4K (1,33 % ; solubilité maximum)		55 (++)
Dissuccinoyl monoperoxyde (10 %)		35 (+)

(+) inhibition certaine ;

(++) inhibition probable.

Nous avons vérifié : 1° que la surcharge pondérale du papier après dessiccation augmente avec la concentration de

la solution d'imprégnation. Ainsi dans le cas du nitrite de sodium, l'augmentation de poids du papier imprégné après dessiccation passe de 4 % pour la solution la plus diluée (0,5 %) jusqu'à 30 % pour la solution la plus concentrée (10 %).

2° Que l'inhibition ne peut être attribuée à une modification de la température de combustion. En effet, la température maximum atteinte dans la cheminée de notre appareillage se situait entre 800 et 900°, selon le degré de tassement du papier, aussi bien pour le témoin que pour les papiers traités.

L'interprétation de ces résultats est évidemment différente selon qu'on admet une simple pénétration des dérivés oxygénés au sein de la cellulose, ou une transformation plus profonde de la structure même de cette dernière.

Dans le premier cas, on peut attribuer l'inhibition à la suroxygénation provoquée dans la masse du papier en combustion par la décomposition des produits incorporés. A l'appui de cette première interprétation, rappelons que le papier brûlé en feuilles minces - donc en atmosphère très oxygénée - ne forme pas de benzo-3,4 pyrène, alors qu'il en produit des quantités notables par combustion à l'état tassé - donc en anoxie partielle - . Il est admis qu'en suroxygénation les substances cellulosiques sont totalement dégradées en gaz carbonique et eau, tandis qu'en sous-oxygénation leur

pyrodestruction conduit à des molécules hydrocarbonées de type acétylénique, lesquelles serviraient de matière première pour la pyrosynthèse ultérieure d'hydrocarbures polycondensés, comme nous l'avons indiqué. L'oxygène libéré par des composés étudiés inhiberait la pyroformation du benzo-3,4 pyrène en rendant plus totalement la combustion du papier.

On peut également concevoir que l'oxygène et les résidus très oxygénés interviendraient au cours des enchaînements réactionnels de la pyropolycondensation. Nous avons suggéré cette possibilité pour interpréter le rôle des produits azotés issu de la décomposition du sulfamate d'ammonium. Nous avons montré que ce rôle peut être conçu selon divers mécanismes. L'un d'eux aurait le mérite de s'appliquer également aux résidus de décomposition des sels ammoniques et des composés oxygénés en particulier du nitrite de sodium : il tiendrait à la formation de radicaux libres qui limiteraient, en la détournant sur eux-mêmes, l'autocondensation des premiers résidus hydrocarbonés formés par dégradation de la cellulose.

Enfin dans le cas d'une transformation structurale ou chimique de la cellulose au cours de l'imprégnation, il faudrait admettre que la chaîne polyosique néoformée subirait une pyrodécomposition notablement différente de celle de la cellulose elle-même, en engendrant notamment des résidus hydrocarbonés moins polymérisables.

Quoi qu'il en soit du mécanisme de cette action, il apparaît que la modification de combustion induite par la pyrodestruction des composés en surcharge dans la matière cellulosique permet de réaliser une inhibition valable du taux de polycondensation. Nous examinerons plus loin la possibilité d'en effectuer l'application à la cigarette totale, en dépit des réserves que peut soulever l'interprétation des résultats dans ce dernier cas.

B) Description des expériences d'inhibition par des composés oxygénés

1°) Recherche du benzo-3,4 pyrène dans les goudrons de combustion de 100 g de papier à cigarettes "vergé égyptien"

Nous avons d'abord vérifié que le pourcentage de benzo-3,4 pyrène formé par combustion de 100 g de papier "vergé" était semblable à celui que nous avons obtenu à partir de 300 g du même papier français et du papier américain. En effet, pour des raisons de commodité pratique, nous avons effectué nos recherches d'inhibiteurs sur une quantité suffisante standard de 100 g de papier "vergé".

Combustion : 100 g de papier "vergé". Température maximum de combustion : 880 °

Traitement chimique : Techniques habituelles.

1) Sur alumine : 140 x 20 mm ; élution au benzène ;

- 2) Sur alumine : 120 x 20 mm ; élution par les mélanges
suivants : 95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène
90 cm³ de cyclohexane + 10cm³ de benzène,
etc ...

Résultats : Les dosages ont été effectués sur les échantil-
lons correspondants au mélange d'élution par
70 cc de cyclohexane et 30 cc de benzène. Les
courbes de fluorescence de ces mélanges présen-
taient les maxima caractéristiques de la courbe
du benzo-3,4 pyrène de référence :

Dosage :

- a) d'après les courbes de fluorescence 97 %
b) d'après les courbes d'absorption 97 %

Nos résultats antérieurs, rapportés à 100 g de papier
étaient :

83 % de benzo-3,4 pyrène dans nos premières expériences
(250 % pour 300 g)

62 % de benzo-3,4 pyrène dans nos expériences de surcharge
(31 % pour 50 g)

Il ne serait pas rigoureux de comparer les résultats
notés à partir de différents poids de papier. C'est la rai-
son pour laquelle nous donnons ici une expérience témoin
pour servir de référence à nos essais d'inhibition. De tou-
tes façons, il ressort des indications précédentes que la
valeur moyenne de la réponse pour 100 g de papier se situe

à $80 \pm 20 \%$. Une inhibition devra donc abaisser la quantité de benzo pyrène à moins de 50% pour 100 g pour être significative.

2) Effet inhibiteur du bichromate de sodium sur la formation du benzo-3,4 pyrène dans la combustion du papier à cigarettes

Imprégnation : 100 g de papier ; immersion pendant 17 h dans 5 litres d'une solution aqueuse à 1 % de $\text{Cr}_2\text{O}_7\text{Na}_2$. Il faut noter que ce traitement au bichromate - comme ceux opérés avec d'autres oxydants - provoque certainement des modifications chimiques importantes de la cellulose, telles que : transformation partielle en oxycellulose, coupures entre les cycles de la chaîne ou même dégradation en acides ... Un tel traitement peut aussi entraîner une modification de la structure physique de la cellulose, au niveau subcristallin.

Combustion et traitement : Techniques habituelles.

Chromatographies :

- 1) Sur alumine. 150 x 20 mm ; élution au benzène
- 2) Sur alumine. 100 x 20 mm ; élution par les mélanges suivants : 95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène
90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène,
etc ...

A ce stade, un dosage par fluorescence à température ambiante nous permet d'évaluer à 56% environ la quantité

de benzo-3,4 pyrène présente dans les goudrons de ce papier. Sachant que la quantité de benzo-3,4 pyrène dosé dans 100 g de papier non traité est de 90 γ environ, il est difficile de considérer le bichromate de sodium, à cette concentration, comme un inhibiteur valable de la pyroformation du benzo-3,4 pyrène.

3) Effet inhibiteur du permanganate de potassium sur la formation du benzo-3,4 pyrène dans la combustion du papier à cigarettes

1ère expérience :

Imprégnation : 100 g de papier "vergé" ; immersion pendant 18 heures dans 5 litres d'une solution aqueuse à 0,2 % de MnO_4^K .

Combustion et traitement : techniques habituelles.

Chromatographies :

- 1) Sur alumine. 160 x 20 mm ; élution au benzène ;
- 2) Sur alumine. 140 x 10 mm ; élution avec les mélanges suivants : 95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène
90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène,
etc ...

Dosage : 28 γ

2ème expérience :

Imprégnation : 100 g de papier ; immersion pendant 18 heures dans 5 litres d'une solution à 1 % de MnO_4^K .

Combustion et traitement : techniques habituelles.

Chromatographies :

- 1) Sur alumine. 140 x 20 mm ; élution au benzène :
- 2) Sur alumine. 150 x 20 mm ; élution avec les mélanges suivants : 95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène
90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène,
etc ...

Dosage : I4 Y

Cette seconde expérience confirme ainsi l'effet inhibiteur du MnO_4K déjà décelé lors de la première expérience et semble indiquer l'existence d'une corrélation entre l'importance de cet effet et le taux d'imprégnation du papier.

4) Effet inhibiteur du nitrite de sodium

a) essai préliminaire

Imprégnation : 100 g de papier ; immersion pendant 17 heures dans 5 litres d'une solution aqueuse à 5 % de NO_2Na ; essorage ; dessiccation à l'air libre, vers 30°.

Combustion et traitement : techniques habituelles.

Chromatographies :

- 1) Sur alumine 150 x 20 mm ; élution au benzène :
- 2) Sur alumine 120 x 7 mm ; élution par les mélanges suivants : 95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène,
90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc ...
- 3) Sur alumine 100 x 7 mm ; élution par des mélanges identiques à ceux de la deuxième chromatographie.

4) Sur silice 140 x 7 mm ; élution par des mélanges identiques à ceux de la deuxième chromatographie.

Résultats de l'analyse spectroscopique.

L'étude quantitative en U.V. des deux seuls échantillons présentant un spectre de fluorescence comparable à celui du benzo-3,4 pyrène pur, permet d'évaluer à moins de 9 % la quantité de benzo-3,4 pyrène présent dans les éluats. L'effet inhibiteur du nitrite de sodium semble ainsi comparable à celui du sulfamate d'ammonium et mérite une étude plus approfondie.

b) Deuxième expérience

Imprégnation : 100 g de papier "vergé" ; immersion pendant 17 heures dans 5 litres d'une solution aqueuse à 2,5 % de NO_2Na .

Combustion et traitement : techniques habituelles.

Chromatographies :

- 1) Sur alumine 190 x 20 mm ; élution au benzène ;
- 2) Sur alumine 140 x 20 mm ; élution par les mélanges suivants : 95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène
90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc ...
- 3) Sur alumine 120 x 20 mm ; élution par les mêmes mélanges que précédemment.

A ce stade, nous avons effectué les dosages sur les échantillons correspondant aux mélanges d'élution 70 cm³ de cyclohexane + 30 cm³ de benzène et 65 cm³ de cyclohexane +

35 cm³ de benzène, dont les spectres de fluorescence sont comparables à celui du benzo-3,4 pyrène.

Résultats : Dosage à partir du spectre de fluorescence 20 γ

Dosage à partir du spectre d'absorption UV 17 γ

L'effet inhibiteur indiqué dans l'essai préliminaire se trouve donc confirmé. De plus cet effet semble varier proportionnellement au taux de concentration des solutions d'imprégnation de départ.

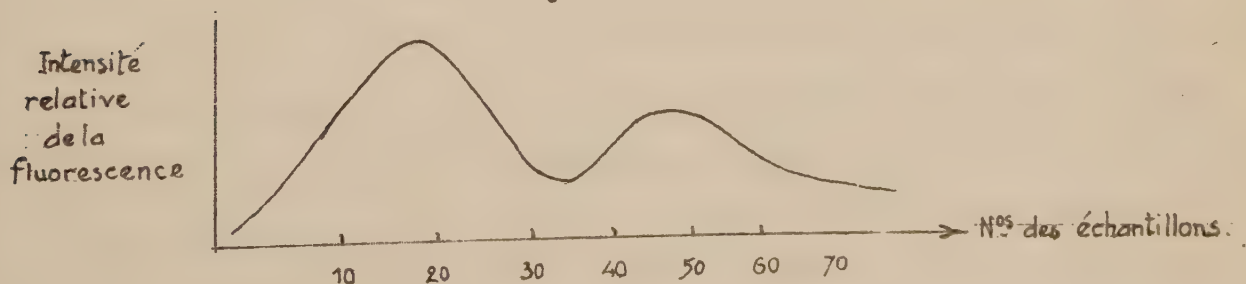
c) Troisième expérience

Imprégnation : 100 g de papier "vergé" ; immersion pendant 17 heures dans 5 litres d'eau à 10 % de NO₂Na; décantation de la solution ; dessication lente à 70° dans l'étuve.

Après ce traitement l'échantillon de papier pèse 130 g.

Combustion et traitement : techniques habituelles. Températures de combustion : 840°.

La première chromatographie a été effectuée sur une colonne d'alumine de 130 mm. de haut et de 20 mm de diamètre. Par élution au benzène nous avons collecté 78 échantillons d'environ 60 cm³ chacun. L'intensité de la fluorescence des échantillons se répartit de la façon suivante :



D'autre part, l'aspect qualitatif des spectres de fluorescence de chacun de ces échantillons permet de penser que le benzo-3,4 pyrène passe entièrement avant le n°30. Cependant pour éviter toute erreur possible nous avons rassemblé nos échantillons en deux groupes : l'ensemble des n° 1 à 30 forment la fraction A et celui des n° 31 à 78 la fraction B.

La fraction A est soumise à une seconde chromatographie (colonne d'alumine 80 x 20 mm) suivie d'élution par les mélanges suivants :

95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène ;

90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc ...

Les courbes obtenues permettent un dosage du benzo-3,4 pyrène.

Résultats : A partir des spectres de fluorescence :
entre 4 et 4,5 μ

A partir des spectres d'absorption : 4 $\mu \pm 0,5$

Pour éviter toute contestation sur la nature exacte du produit dosé nous soumettons les échantillons de l'analyse quantitative à une ultime chromatographie (sur alumine 55 x 20 mm) avec élution à l'aide de mélanges identiques à ceux de la précédente chromatographie. Nous obtenons alors des échantillons qui, après distillation de leur solvant et reprise par le cyclohexane pur, présentent un spectre de fluorescence caractéristique du benzo-3,4 pyrène.

Le tableau ci-après reproduit la position des maxima enregistrés par analyse de notre échantillon en fluorescence, et la position des maxima correspondants présentés par le benzo-3,4 pyrène de référence :

Benzo pyrène de référence	4036	4089	4271	4537
Echantillon	4037,5	4091	4278	4558
Déplacement	+ 1,5	+ 2	+ 7	+ 20

La fraction B est également soumise à une nouvelle chromatographie sur alumine (100 x 20 mm) avec élution par les mélanges suivants :

95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène

90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc ...

Cette chromatographie confirme le fait pressenti dès la première chromatographie : l'absence de benzo-3,4 pyrène dans cette fraction.

Il ressort de cette nouvelle expérience que le nitrite de sodium inhibe d'une façon certaine la formation de benzo-3,4 pyrène au cours de la combustion de papier à cigarettes et que cette action est d'autant plus importante que la concentration en nitrite de sodium de la solution d'imprégnation de départ est plus forte.

d) Quatrième expérience.

Imprégnation : 100 g de papier ; immersion pendant 17 heures dans 5 litres d'eau à 0,5 % de NO₂Na ; décantation de la solution et dessiccation lente à 70° dans l'étuve. Après ce

traitement l'échantillon de papier pèse 104 g.

Combustion et traitement : techniques habituelles.

Chromatographies :

- 1) Sur alumine 90 x 20 mm ; élution au benzène ;
- 2) Sur alumine 120 x 20 mm ; élution par les mélanges suivants : 95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène
90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc ...

Résultats : Dosage à partir du spectre de fluorescence :

88 ✓

La comparaison des résultats de ces quatre expériences montre bien l'influence de la concentration de la solution d'imprégnation sur l'intensité de l'effet inhibiteur :

Papier non imprégné (expérience de référence)	97	✓
NO ₂ Na (solution à 0,5 %)	88	✓
" (solution à 2,5 %)	20	✓
" (" à 5 %)	8	✓
" (" à 10 %)	4	✓

5) Effet inhibiteur du perchlorate de sodium

Imprégnation : 100 g de papier : immergé pendant 17 heures dans une solution aqueuse de perchlorate de sodium. Après séchage à 70° dans l'étuve, l'échantillon pèse 112 g.

Température de combustion : 800° environ

Traitement : habituel.

Chromatographies :

- 1) Sur alumine 120 x 20 mm ; élution au benzène ;

2) Sur alumine 120 x 20 mm ; élution par les mélanges
suivants : 95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène
90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc...

Dosage : 27 γ

6) Effet inhibiteur du perchlorate de potassium

Imprégnation : 100 g de papier ; immergé pendant 17 heures
dans une solution aqueuse saturée de perchlorate de potas-
sium (soit 66 grammes de ClO₄K dans 5 litres d'eau; concen-
tration : 1,33 %). Après décantation, séchage à 70° dans
l'étuve; l'échantillon pèse 103 g.

Température de combustion : 800°

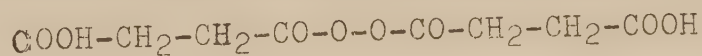
Traitement : habituel.

Chromatographies :

1) Sur alumine. 80 x 20 mm; élution au benzène
2) Sur alumine 120 x 20 mm; élution par les mélanges
suivants : 95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène
90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc...

Dosage : 55 γ

7) Effet inhibiteur du mono peroxyde dissuccinoylique



Imprégnation : 100 g de papier ; immergé pendant 17 heures
dans une solution de 20 g de mono peroxyde dissuccinoylique
dans 2 litres d'eau.

Température de combustion : 840°

Combustion et traitement : technique habituelle.

Chromatographies :

- 1) Sur alumine. 130 x 20 mm ; élution au benzène.
 - 2) Sur alumine. 120 x 20 mm ; élution par les mélanges suivants : 95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène
90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc ...
 - 3) Sur alumine. 100 x 20 mm ; élution avec des mélanges identiques à ceux de la chromatographie précédente.
- Résultats : Dosage à partir du spectre de fluorescence : 35 %
Dosage à partir du spectre d'absorption : 39 %

8) Action inhibitrice du métavanadate de sodium VO₃Na)

Imprégnation : 100 g de papier "vergé" ; immersion pendant 17 heures dans 5 litres d'une solution aqueuse à 0,2 % de VO₃Na. La faible solubilité du métavanadate de sodium à froid dans l'eau nous a conduit à utiliser cette concentration limite.

Combustion et traitement : techniques habituelles.

Chromatographies :

- 1) Sur alumine. 190 x 20 mm ; élution au benzène
- 2) Sur alumine. 120 x 20 mm ; élution avec les mélanges suivants : 95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène
90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc...
- 3) Sur alumine : 140 x 10 mm ; élution avec des mélanges identiques à ceux utilisés dans la précédente.

Résultats de l'analyse spectroscopique :

Un dosage approximatif par comparaison du spectre de fluorescence avec celui d'une solution de concentration connue en benzo-3,4 pyrène, permet d'évaluer la quantité de benzo-3,4 pyrène présent dans ces goudrons, comme sensiblement égale à celle que l'on a déterminée pour un papier non traité.

9) Effet inhibiteur de l'eau oxygénée

Imprégnation : 102 grammes de papier ; immersion pendant 17 heures dans 290 cc d'eau oxygénée à 110 volumes ; lavage à l'eau ; séchage à 70° dans l'étuve. On ne retrouve plus que 85 grammes de papier à la pesée. Ceci n'a rien d'étonnant puisque certaines oxycelluloses sont solubles dans l'eau.

Température de combustion : 750°

Traitement : habituel.

Chromatographies :

- 1) Sur alumine. 100 x 20 mm ; élution en benzène :
- 2) Sur alumine. 80 x 20 mm ; élution par les mélanges suivants :
95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène
90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène,
etc ...

Résultats :

Dosage à partir du spectre de fluorescence 33 X

Ramené à une quantité de 100 grammes de papier, on peut estimer la quantité de benzo-3,4 pyrène formé à 38 $\times$

Essai d'inhibition de la pyroformation du benzo-3,4 pyrène dans la combustion de la cigarette totale.

Nous avons essayé de transposer à la cigarette totale l'inhibition que produit l'imprégnation du papier avec des composés azotés ou oxygénés. Dans un premier stade, nous avons examiné si l'imprégnation du seul papier dans la cigarette suffit à diminuer le taux de production du benzo-3,4 pyrène par combustion de celle-ci. Nous avons ensuite étudié la pyroformation de l'hydrocarbure à partir de cigarettes dont le tabac lui-même avait été additionné d'inhibiteur.

A) Etude d'un goudron de cigarettes à papier sulfamaté.

Ces cigarettes furent confectionnées avec du tabac noir ordinaire et du papier au sulfamate d'ammonium identique à celui que nous avons utilisé dans nos précédentes expériences. Un lot de ces cigarettes spéciales fut préparé par les soins du SEITA.

La combustion d'un certain nombre de ces cigarettes, a été effectuée dans une machine standard simultanément à celle de cigarettes témoins. Nous avons procédé à l'analyse comparative des deux goudrons obtenus.

1° Dosage du benzo-3,4 pyrène dans les goudrons de cigarettes à papier sulfamaté

Les goudrons ont été préparés dans la machine à fumer du SEITA. Ils correspondent à la combustion de 360 cigarettes traitées. Nous avons appliqué à ce goudron le traitement chimique habituel.

Chromatographies :

1°) Sur alumine. 100 x 50 mm ; élution au benzène.

Dosage à partir des courbes de fluorescence à basse température : 11,5 %

2°) Sur alumine. 120 x 20 mm ; élution sous pression d'air avec les mélanges suivants :

95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène ;

90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc ...

Dosage à partir des courbes de fluorescence à température ordinaire : 9,6 %

3°) Sur alumine 70 x 20 mm ; élution sous pression d'air par des mélanges identiques à ceux de la précédente chromatographie.

Dosage par fluorescence à température ordinaire :

... 7,5 %

4°) Sur silice. 70 x 20 mm ; élution identique.

Dosage à partir des courbes de fluorescence à température ordinaire : 6,7 %

5°) Sur alumine. 50 x 20 mm ; élution sous pression d'air avec les mêmes mélanges.

Dosages : par fluorescence à température ordinaire : .. 4,4 γ
par absorption 5,7 γ

6^o) Sur silice. 40 x 20 mm ; élution par les mélanges
correspondants à ceux de la précédente.

Dosage par absorption : 3,6 γ

A ce stade l'appréciation qualitative de la courbe
d'absorption paraît suffisamment valable pour arrêter la
série des chromatographies, et permettre la comparaison
avec les courbes obtenues jusqu'alors.

2^o) Expérience témoin

Cette expérience, dont les indications doivent re-
couper les résultats enregistrés sur le goudron de I040
cigarettes a pour objet d'établir une comparaison à chaque
stade des chromatographies avec l'expérience précédente.

Les goudrons également préparés dans la machine à
fumer du SEITA, correspondent à la combustion de 490 ciga-
rettes. Nous avons appliqué le traitement chimique usuel.

Chromatographies :

1^o) Sur alumine. 60 x 50 mm ; élution au benzène.

Dosage à partir des courbes de fluorescence à basse tempé-
rature : 16 γ

Si l'on ramène cette quantité de benzo-3,4 pyrène à
celle correspondant à 360 cigarettes (nombre de cigarettes
utilisées dans l'expérience avec cigarettes à papier sulfa-
maté) on a : 11,76 γ .

(Or à ce stade du traitement , on estimait à 11,5 γ la quantité de benzo-3,4 pyrène formé par la combustion d'un même nombre de cigarettes dont le papier avait au préalable subi un traitement au sulfamate).

2^o) Sur alumine. 70 x 20 mm ; élution sous pression d'air avec les mélanges suivants :

95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène ;

90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc ...

Un dosage par fluorescence à température ambiante n'est pas possible, les courbes qualitatives n'étant pas suffisamment précises. A ce stade, ces courbes étaient déjà satisfaisantes dans le cas des cigarettes à papier sulfamaté .

3^o) Sur alumine. 90 x 20 mm ; élution sous pression d'air par des mélanges identiques aux précédents.

Dosage par fluorescence à température ambiante : 6,9 γ qui, ramenés à 360 cigarettes correspondent à 5 γ

(Quantité trouvée à ce stade pour les cigarettes à papier traité : 7,5 γ).

L'évolution de la purification de ces goudrons témoin semble ainsi correspondre à celle des goudrons de cigarettes à papier sulfamaté. Nous jugeons raisonnable d'arrêter à ce niveau le traitement des goudrons des cigarettes témoin. En, effet, l'appréciation quantitative après la première chromatographie semble suffisante pour établir un rapprochement

entre les deux expériences, compte-tenu :

1^o) des limites de précision de notre méthode de dosage;

2^o) des extrapolations possibles, justifiées par nos expériences précédentes et donnant à partir des résultats quantitatifs de la première chromatographie une valeur finale dont l'approximation reste du domaine d'erreur de notre méthode.

3^o) des impossibilités matérielles de reproduire (avec une rigoureuse exactitude) deux systèmes de purification et de dosage (à cause des différences portant en particulier sur le degré de tassement de l'alumine, sur le laps de temps entre la fin de l'élution et le dosage effectif, etc..).

De plus, le pourcentage de benzo-3,4 pyrène décelé dans les goudrons de cigarettes à papier sulfamaté (3,6 $\%$ pour 360 cigarettes soit, environ, 10 $\%$ pour 1000) correspond bien à celui que nous avons trouvé au même stade de purification, dans notre première expérience sur cigarettes ordinaires.

Conclusions :

A la lueur de ce résultat, et des extrapolations qu'il nous semble logique d'effectuer, nous pouvons admettre :

1^o) Que l'imprégnation au sulfamate du seul papier de la cigarette n'entraîne aucun abaissement significatif du taux de pyroformation du benzo-3,4 pyrène ;

2^o) Qu'en conséquence, le papier n'intervient pas d'une

façon appréciable dans la formation du benzo-3,4 pyrène au cours d'une combustion de cigarette totale. En effet, puisque le sulfamate d'ammonium inhibe à 95 % le taux de pyroformation du benzo-3,4 pyrène dans la combustion du seul papier, la proportion d'hydro-carbure provenant de cigarettes à papier traité aurait dû être diminuée par rapport à celle provenant de cigarettes témoin, dans une mesure correspondant à l'apport propre de ce papier. L'absence de diminution indique donc le rôle négligeable du papier.

3^o) Toute tentative d'inhibition de la formation du benzo-3,4 pyrène au cours de la combustion de cigarettes par simple traitement chimique du seul papier, paraît vouée à l'échec.

Ce résultat ne peut guère nous étonner. En effet, le papier brûle à la partie extérieure de la cigarette et sous une faible épaisseur, donc en atmosphère suffisamment oxygénée. Ainsi, il ne participe pas à la formation du benzo-3,4 pyrène, comme l'ont montré nos propres observations et celles de Wynder. Au contraire, le tabac lui-même subit un processus de combustion très anoxique favorable à la pyroformation du benzo-3,4 pyrène et ceci d'autant plus fortement qu'il se situe dans les couches internes concentriques du cylindre cigarette.

Lors de nos expériences sur la cigarette totale brûlée à l'état tassé dans notre cheminée à combustion (expé-

rience dite "modèle tabac"), nous avons noté les contributions respectives de la fraction papier et de la fraction tabac à la pyroformation du benzo-3,4 pyrène. Ceci ne contredit pas nos derniers résultats, puisque le papier à cigarette dans ce type de brûlage, était soumis lui aussi à une combustion en anoxie relative, au même titre que celle du tabac.

Notre expérience élimine donc définitivement la conception suivant laquelle le papier à cigarettes supporterait en totalité ou en grande partie la responsabilité de la pyroformation du benzo-3,4 pyrène dans la cigarette. Ce résultat mérite d'être rapproché de celui tout récent de Larson qui n'a trouvé aucune radioactivité dans les hydrocarbures polycycliques isolés d'un goudron provenant de la combustion de cigarettes fabriquées avec un papier marqué au C 14 (59).

Nous pouvions cependant espérer que la surcharge chimique du papier aurait pu intervenir dans les processus réactionnels qui conduisent à la formation du benzo-3,4 pyrène à partir du tabac, par suite d'une diffusion de l'inhibiteur au sein de la masse en combustion. Il faut noter que de ce point de vue, notre expérience n'est pas significative. En effet la quantité de sulfamate d'ammonium inclu dans le papier de la cigarette traitée ne serait probablement pas suffisante pour entraîner une inhibition d'un poids de papier correspondant à celui de cette cigarette. En conséquence

une intervention par interaction ou diffusion du papier au tabac reste éventuellement possible quoique tout à fait hypothétique.

L'impossibilité d'inhiber la pyroformation du carbure cancérigène par imprégnation du seul papier nous a conduit à étudier l'effet d'une imprégnation de la cigarette totale.

B) Etude d'un goudron de cigarettes imprégnées par du nitrite de sodium

Les cigarettes utilisées ont été fabriquées au SEITA. Elles comprenaient un tabac chargé de NO_2Na (à 4,6 % du produit sec) et un papier normal du type "vélin gauloisé".

Combustion : 1000 cigarettes ont été brûlées dans la machine à fumer simplifiée dite "Modèle cigarettes". La température de combustion se situait comme d'habitude entre 700 et 850°. L'aspect des cendres était légèrement différent de celui de cendres issues de cigarettes non traitées.

Traitement : Identique à celui appliqué aux goudrons obtenus dans le même "modèle cigarettes".

Chromatographies :

- 1) Sur Al_2O_3 : 140 x 50 mm ; élution au benzène.
- 2) Sur Al_2O_3 : 150 x 40 mm ; élution avec les mélanges suivants :

195 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène

190 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc ...

- 3) Sur Al_2O_3 : 120 x 20 mm ; élution sous vide par les

mélanges suivants :

95 cm³ de cyclohexane + 5 cm³ de benzène

90 cm³ de cyclohexane + 10 cm³ de benzène, etc ...

4) Sur Al₂O₃ : 80 x 20 mm ; élution sous vide par les mélanges identiques à ceux de la précédente.

5) Sur Al₂O₃ : 90 x 20 mm ; élution sous vide par les mêmes mélanges.

6) Sur SiO₂ : 70 x 20 mm ; élution avec les mêmes mélanges.

7) Sur SiO₂ : 80 x 20 mm ; élution avec les mêmes mélanges.

8) Sur Al₂O₃ : 50 x 20 mm ; élution avec les mêmes mélanges.

Résultat des dosages : a) En fluorescence 70 %

b) En absorption 118 %

A ce stade de l'analyse et pour une qualité de courbe identique nous trouvons dans l'expérience témoin des résultats similaires.

Conclusion :

Il n'y a pas d'inhibition apparente. (Il faut toutefois rappeler que dans ce cas, l'appréciation d'un effet inhibiteur est rendue très difficile par la complexité des goudrons).

Cet échec peut être dû au fait que dans les cigarettes étudiées la surcharge en NO₂Na était trop faible pour être efficace. En effet, la concentration en sel d'imprégnation ne dépassait pas 5 %. Or nous avons vu dans le cas du papier l'importance de la quantité de la surcharge pour l'obtention d'un effet inhibiteur appréciable. De plus, l'imprégnation du

papier était réalisée par immersion prolongée dans la solution saline. Dans le cas présent, l'inhibition du tabac fut réalisée par simple aspersion. Si l'action inhibitrice du sel est due à une transformation structurale préalable de la matière cellulosique ou à une pénétration profonde du nitrite dans cette matière l'imprégnation réalisée ici aura été très insuffisante.

Au demeurant, la présente expérience offrait seulement un intérêt théorique, la consommation de cigarettes nitritées n'étant pas possible, pour des raisons évidentes de toxicité de l'additif NO_2 .

C) Sur la possibilité d'inhiber la pyroformation du benzo-
3,4 pyrène par surcharge chimique des cigarettes de
consommation courante

A priori, aucune objection théorique ne semble devoir empêcher la transposition à la cigarette totale de l'inhibition que nous avons étudiée sur le papier seul. Cependant, la réalisation pratique d'une cigarette rendue inoffensive par imprégnation chimique suscite de nombreuses difficultés. Nous avons vu, en effet, que le traitement de son seul papier ne suffit pas à diminuer le taux de pyropolycondensation. Or le traitement chimique du tabac ne peut pas être effectué aussi facilement que celui du papier. La surcharge atteindra difficilement la concentration minimum nécessaire à l'obtention d'une inhibition appréciable et qui soit, en même temps, com-

patible avec le maintien des qualités propres à la consommation. Mis à part les déformations de goût que provoquerait l'imprégnation, celle-ci pourrait induire l'apparition de nouveaux effets toxiques. La réalisation de cigarettes inoffensives du point de vue cancérologique n'appartient plus tellement au domaine de la recherche fondamentale, mais relève d'une mise au point technique dont seuls les spécialistes de l'industrie du tabac sont susceptibles d'aborder l'étude.

Dans ce domaine les divers essais tentés à l'étranger pour la fabrication de cigarettes non cancérogènes n'ont pas plus abouti que les nôtres. C'est ainsi que les fabricants anglais ont noté des propriétés inhibitrices du nitrate de cuivre et du diamono nitrite de platine (60) parmi de nombreux autres composés testés. Les substances en question n'ont pu être retenues pour l'imprégnation des cigarettes totales, soit à cause du mauvais goût qu'elles provoquent, soit à cause de leur trop faible action inhibitrice.

Quant aux tentatives réalisées avec des produits aussi divers que l'essence de noix de coco raffinée (51) ou la chlorophylle, elles ne semblent pas avoir été suivies d'une exploitation pratique.

C O N C L U S I O N

Le présent travail nous a permis de préciser un certain nombre des données du complexe problème que pose la pyroformation des hydrocarbures cancérigènes à partir des matières cellulosiques. Nos résultats apportent quelques documents nouveaux à un dossier déjà considérable. La conclusion d'une étude expérimentale consiste à resserrer les faits qu'elle définit en une doctrine synthétique. Dans le cas présent, il n'est pas possible de donner un schéma simple qui puisse englober toutes les données connues quant à l'origine et à la détection des composés polycycliques dans les goudrons. Nous éviterons donc de soumettre nos propres résultats à une coordination de principe. Nous pouvons cependant en dégager quelques indications de portée générale qui représentent l'essentiel de notre contribution :

1^o) Les cigarettes françaises à tabac noir produisent, par combustion, du benzo-3,4 pyrène comme toutes les cigarettes à tabac blond qui ont été étudiées jusqu'ici dans le monde. La présence de l'hydrocarbure dans les extraits de goudrons est prouvée par les indications suivantes :

a) Identification par les spectres d'absorption et de fluorescence ;

b) Identification par le R_f en chromatographie sur papier ;

c) Superposition du benzo-3,4 pyrène pur mis en surcharge avec le carbure isolé des goudrons ;

2^o) L'hydrocarbure se forme également à partir du papier à cigarettes commercial brûlé dans certaines conditions. Cette partie de notre travail nous a conduit à montrer le rôle du degré d'oxygénation sur le taux de la pyropolycondensation. La température intervient également.

3^o) L'étude analytique de mélanges aussi complexes que les extraits de goudron justifie l'emploi de méthodes optiques très précises. La fluorescence à basse température nous a permis une identification du benzo-3,4 pyrène avec une précision qui n'avait pas été obtenue par d'autres méthodes.

4^o) Pourtant, les dosages de l'hydrocarbure, effectués par voie spectroscopique après fractionnement, souffrent d'une incertitude qui provient des pertes au cours des opérations de traitement chimique et de sélection chromatographique des goudrons. Ces incertitudes n'empêchent pas de comparer les divers résultats; mais elles conduisent à sous-estimer la quantité de l'hydrocarbure effectivement présent dans le goudron.

5^o) La pyroformation du benzo-3,4 pyrène à partir du papier brûlé en anoxie peut être inhibée par des composés chimiques oxydants. Ces composés exercent leur effet après

imprégnation dans le papier. Leur action est due, sans doute, à l'élévation du niveau d'oxygénation de la combustion. L'effet d'inhibition est d'autant plus net que la concentration de l'inhibiteur au sein de la matière en combustion est plus importante.

6°) Le papier n'intervient pas ou ne joue qu'un rôle accessoire dans la formation du benzo-3,4 pyrène par combustion de la cigarette totale.

7°) L'imprégnation chimique constitue une voie de recherches plausible pour la mise au point d'une cigarette de potentiel carcinogène diminué. Les travaux effectués par les services techniques spécialisés apporteront une réponse à ce sujet.

Les indications que nous avons données dépassent certainement le champ des seuls goudrons d'origine tabagique. Elles contribuent à éclaircir certains aspects du mécanisme général de la pyropolycondensation des résidus moléculaires formés par craquage thermique de substances complexes.

BIBLIOGRAPHIE

Ière partie : références à nos propres travaux.

- A) "Détection quantitative du benzo-3,4 pyrène formé par combustion du papier à cigarettes et du tabac"
par Latarjet (R.), Cuzin (J.L.), Hubert-Habart (M.)
Muel (B.) et Royer (R.)-Bull. du Cancer, 1956, 43, N°2
180 - 198.
- B) "Etude du dibenzo-4,4; 9,10 pyrène : Spectre de fluorescence et séparation chromatographique du benzo-3,4 pyrène"
par Muel (B.), Hubert-Habart (M.) et Buu-Hoï (N.P.)
Journal de Chimie physique, 1957 483
- C) "Spectre de phosphorescence du benzo-3,4 pyrène en solution congelée à -180° C"
par Muel (B.) et Hubert-Habart (M.)
Journal de Chimie physique, 1958 377.
- D) "Inhibition chimique de la formation du benzo-3,4 pyrène lors de la combustion du papier à cigarettes"
par Royer (R.), Hubert-Habart (M.), Muel (B.) et Latarjet (R.)
Communication au Congrès de Cancérologie - Londres -
Juillet 1958.
- E) "Dosages d'hydrocarbures polycycliques, notamment du benzo-3,4 pyrène, dans les condensats de fumées.
Etude critique de la signification des résultats"
"sous presse"

F) "Le régime de pyrogénéation de la cigarette "
par Cuzin (J) et Collab.

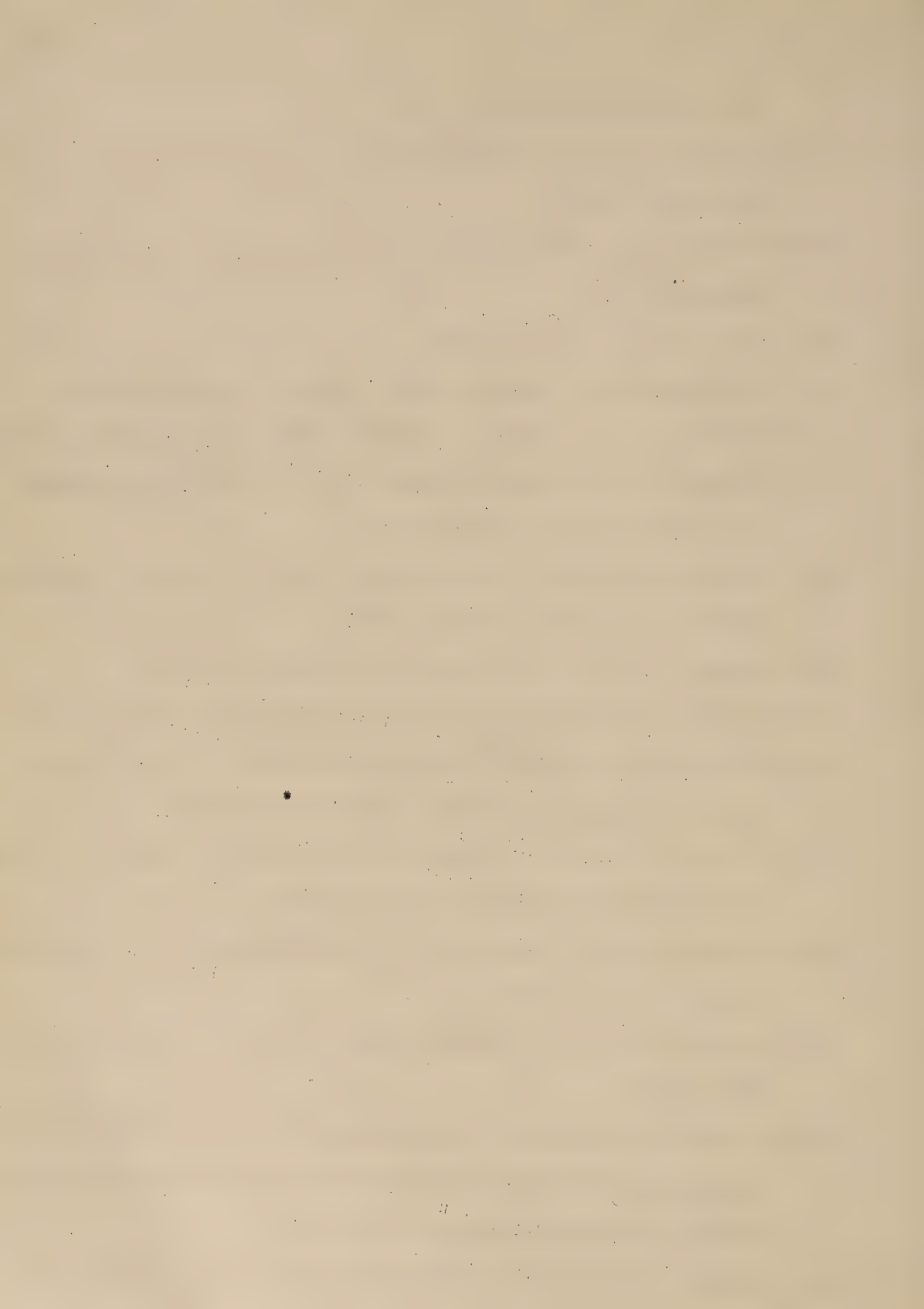
Actes du deuxième Congrès scientifique international
du tabac Juin 1958 p.536.

2ème partie : références générales.

- (1) Doll (R.) et Hill (A.B.) - Brit. Med. J. 1952, N°4797,
I27I - I286
- (2) Wynder (E.L.) Graham (E.A.) et Croninger (A.B.) -
Cancer Res. 13, 855, 1953
- (3) Doll (R.) - adv. Cancer Res. 8, I 1955.
- (4) Doll (R.) et Hill (A.B.) - Brit. Med. J. 1956, 11 I07I.
- (5) Hammond (E.C.) et Horn (D.) - Annual Meeting of the
Am. Med. Ass. New-York City 1957
- (6) Schwartz (D.), Denoix (P.F.) et Anguera (G.) - Bull.
du Cancer, 1957, 44, N° 2 336 36I
- (7) Schwartz (D.) et Denoix (P.F.) - Sem. des Hôp. de
Paris 33^e année N° 62-7 1957
- (8) Schwartz (D.) et Anguera (G.) - Communication Inst.
National de Stat., Stockholm 30ème session 1957.
- (9) Denoix (P.F.) Schwartz (D.) et Anguera (G.) - Bull.
du Cancer 1958 45 N° I II à 37
- (10) Holsti (L.R.) and Ermala (P.) - Cancer 8 679, 1955.
- (11) Commins (B.T.) , Cooper (R.L.) and Lindsey (A.J. -
Brit. J. Cancer 8, 296 1954
- (12) Cooper (R.L.) Lindsey (A.J.) - Chem. et Ind. I205 (1953)
- (13) Cooper (R.L.), Lindsey (A.J.) and Waller (R.E.) Chem

et Ind. 1418 (1954).

- (14) Wynder (E.B.) et Cornfield (J.) - Nax England J. Med. 248, 441 (1953).
- (15) Tobacco manufacturer's standing comittee - Research papers N° 3
- (16) Pott (P.) - London 1775
- (17) Volkmann (R.) - Berl. Klin. Wschrt II p.218, 1874.
- (18) Tillmans (H.) - Dtsch. Ztschr. Chir. t.13, p.519, 1880
- (19) Campbell (J.M.) and Lindsey (A.J.) - British Journal of Cancer, 1957, II 192 195
- (20) Gilbert (J.A.S.) and Lindsey (A.J.) - British Journal of Cancer, 1956, 10 646 - 648
- (21) Greene (C.R.) - Science 15 - 9 vol 122 1955
- (22) Ermala (P.) et Holsti (L.R.) Cancer Res. 1956 p.493.
- (23) Proceeding of the/^{first} Workshop Conference on Lung Cancer Research Virginia Beach, November 7 8 1957
- (24) Trillat (J.J.) et Cuzin (J.L.) - Compt. rend. de l'Acad. des Sciences 1958 tome 246 p.1040
- (25) Schmähl (D.), Consbruck (U) et Druckery (H.) - Arzein Forsh. 4, 71 1954
- (26) Cooper (R.L.) et Lindsey (A.J.) - Brit. J. Cancer 9, 304, 1955.
- (28) Wynder " False and Milsleading advertising" (Filter-tip cigarettes) Twentieth Report by the Comittee on govern-ment operation February 20, 1958.
- (29) Cook (J.W.) Hewet (C.) and Huger (I.) - Nature 130, 926 (1932).



- (30) Sann1é (C.) and Poremski (V.) - Bull. Soc. Chim. (5)
3 1139
- (31) Bonnet (J.) and Neukomm (S.) - Helvetica Chemica Acta,
1956 (39) I724 - I733.
- (32) Van Duren (B.L.) - Journal of the National Cancer
Institute, 1958, 2I I-I6.
- (33) Buu-Hoï (N.P.) et Jacquignon (P.) - Experientia 1957,
XIII, 9, 375.
- (34) Miller (J.) and Baumann (C.) - Cancer Res. 3 223, 1943.
- (35) Terrien (J.) et Devignes (F.) - Rev. opt . 1948, 27 45I
- (36) Lacassagne (A.), Zajdela (F.); Buu-Hoï (N.P.) et Chal-
vet (H.) - Compt. Rend. de l'acad. des Sciences, 1957
244, 273-274.
- (37) Schpoliski (E.V.) et Guirdgyaouskaïte - Optika et
Spectroscopa 1958 IV 620-630.
- (38) Cuzin (J.L.) -Annales de l'Inst. exp. tabac Bergerac
1956.
- (39) Tarbell (D.S.), Brooker (E.G.), Vanter pool (A.), Conway
(W.), Clauq (C.J.) - J. Amer. Chem. Soc. 77 767 768, 1955
- (40) Wrigth (G.F.) et Wynder (E.L.) - Proceed. Amer. Assoc.
Cancer Res. 2, 2, 159, 1956.
- (41) Alvord (E.T.) et Cardon (S.Z.) - Rapport à l'Annual
meeting AAAS 1955, et Comm. Pers.
- (42) Van Kleeck (A.) - Southern Lumberman Dec., 1940 I96.
- (43) Gordon (W.E.) - Rayon textile Monthly, 22, 898, (194I)
- (44) Cooper (R.L.) Gilbert (J.A.S.) et Lindsey (A.J.) - Brit.
J. Cancer 9,442, 1955.

- (45) Moureu (H.) - Comm. pers.
- (46) Lettre (H.) et Jahn (A.) - Naturwiss. 8, 210, 1955 ;
Angewandte Chem. 68, 212 1956.
- (47) Flory (C.M.) - Cancer Res. 1, 262, 1941.
- (48) Kotin (P.) - Cancer Res. 16 375 1956.
- (49) Fishel (J.B.) et Haskins (J.F.) - Industr. Engegn.
Chem. 41, 1374, 1949.
- (50) Berthelot (M.) - C.R. Acad. Sci. Paris 53, 481, 1866.
- (51) Kennaway (E.L.) - J. Pathol. 27, 233, 1924 - Brit. Med.
J. 2, 1, 1952.
- (52) Lam (J.) - Acta path. Microbiol. Scand. 37, 421, 1955.
- (53) Kennaway (E.L.) - Brit. Med. J. 1925, 11, 1.
- (54) Dickens (F.) et Weil - Malherbe (H.) - Cancer Res.
2. 680 , 1942.
- (55) Badger et AL - J. Chem. Soc. G.B. 1958 July 2449 à
2463 ...
- (56) Sisler (H.H.) and Audrieth (L.F.) - Inorganic Syntheses
II, 179-81 (1946)
- (57) Dewar - Jaresber 1887 - 445.
- (58) Meyer, Wasche - Ber. 1917 - 50 423.
- (59) Larson - Communication personnelle à M. Cuzin, qui nous
l'a transmise.
- (60) Tobacco Manufacturers' Standing Committee - Report for
year ended 31 st May 1958.
- (61) Garcia (E.Y.), Manahan (M.) and Nazario (T.) - J.
Philippine Med. Assoc. 35. 114-18 (1959).

<u>Table des Matières</u>	Pages
<u>Introduction.</u>	4
I - <u>Détection du benzo-3,4 pyrène dans les goudrons :</u>	19
Etude spectroscopique en fluorescence : à la tempé- 23	
rature ambiante - à basse température.	
Spectre de phosphorescence.	40
Absorption U . V .	43
II - <u>Etude d'un goudron de cigarettes gauloises :</u>	46
Détection du benzo-3,4 pyrène	46
Recherche quantitative du benzo-3,4 pyrène	52
III - <u>Etude d'un goudron de papier à cigarettes du type</u>	
<u>"vélin gauloise" :</u>	54
Combustion du papier	54
Analyse chromatographique	56
Résultats du dosage.	57
IV - <u>Etude d'un modèle cigarette</u>	60
V - <u>Origine des hydrocarbures décelés dans la fumée de</u>	66
<u>cigarettes.</u>	
VI - <u>Essai d'appréciation de la valeur des dosages du</u>	72
<u>benzo-3,4 pyrène dans les goudrons de cigarettes.</u>	
VII - <u>Recherche d'inhibiteurs chimiques de la pyrofor-</u>	90
<u>mation du benzo-3,4 pyrène :</u>	
Action du sulfamate d'ammonium	94
Emploi de composés oxygénés : considérations théo-	
riques. - partie expérimentale.	97

VIII - <u>Essai d'emploi inhibiteur de la formation du benzo-</u>	
<u>3,4 pyrène dans la combustion de la cigarette totale</u>	115
Etude d'un goudron de cigarettes à papier sulfamaté :	116
Etude d'un goudron de cigarettes imprégnées par du	
nitrite de sodium .	122
<u>Conclusion.</u>	126
<u>Bibliographie.</u>	129
<u>Table des Matières</u>	134

D E U X I E M E T H E S E

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE

" L'Alcoylation des Phénols"

Vu et approuvé

Paris, le 20 mars 1960

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

Vu :
Permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie
de Paris
Jean SARRAILH

